Klinisch-Biochemische Untersuchung zum Carnitinstoffwechsel des Menschen und zur Diagnostik von Carnitinmangel-Syndromen

Thomas Deufel

1981

Aus der Forschergruppe Diabetes und dem Institut
für Klinische Chemie am Städtischen Krankenhaus
München-Schwabing

Direktor: Prof.Dr. O. Wieland

"Klinisch-Biochemische Untersuchung zum Carnitinstoffwechsel des Menschen und zur Diagnostik von Carnitinmangel-Syndromen"

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilian-Universität zu München

vorgelegt von
Thomas Deufel
aus
Abensberg
Jahr
1981

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
Der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. O. Wieland

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Mehnert

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der Mündlichen Prüfung: 3. Dezember 1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Diese Arbeit widme ich meinem Vater

A EINFÜHRUNG S. 1

B MATERIALIEN UND GERÄTE

C METHODEN

1. Probennahme und Probenvorbereitung S. 5

1.1. Muskelbiopsien S. 5
1.1.1. Entnahme und Lagerung
1.1.2. Aufschluss
1.2. Serum, Plasma S. 5
1.3. Leukocyten S. 6
1.3.1. Mononukleäre Zellen
1.3.2. Granulocyten
1.3.3. Thrombocyten
1.4. Erythrocyten S. 7
1.4.1. Gewaschene Erythrocyten
1.4.2. Erythrocytenmembranen

2. Carnitinbestimmung S.10

2.1. Herstellung der eiweissfreien Extrakte S.11
2.2. Hydrolyse der Carnitinester (Gesamtcarnitin) S.12
2.3. Photometrischer Test S.12
2.3.1. Vorbehandlung zur Entfernung sörender SH-Gruppen
2.3.2. Test
2.4. Wiederfindung aus Serum und Muskelhomogenat S.14
2.5. Reproduzierbarkeit der Bestimmung S.15
2.6. Verwendbarkeit von Heparinplasma zur Bestimmung S.15
2.7. Haltbarkeit der Proben S.15
2.7.1. Muskelproben
2.7.2. Serum und Perchlorsäureextrakt

3. Carnitin-Palmitoyl-Transferase (CPT) in Muskelproben S.19

3.1. Anreicherung der Enzymaktivität aus Muskelhomogenat S.19
3.2. Photometrische Messung der CPT-Aktivität S.21

4. Bestimmung von "Non-Collagen-Protein" (NCP) S.23

D ERGEBNISSE

1. Carnitingehalte in geformten Blutbestandteilen S.24

2. Carnitin im Serum (Plasma) S.29

2.1. Gesunde Versuchspersonen S.29
2.2. Physiologische Schwankungen des Serumcarnitinspiegels S.29
2.3. Serumcarnitinspiegel bei Niereninsuffizienz S.33
2.4. Serumcarnitinspiegel bei Fettsucht und im Hunger S.33
2.5. Serumcarnitinspiegel im Diabetes und im diabetischen Coma S.35

3. Carnitingehalt des Skelettmuskels S.38

4. Carnitin-Palmitoyl-Transferase in Muskelproben S.41

5. Befunde bei metabolischen Myopathien und Carnitinmangel S.42

5.1. Kind C.Z., Kind S.A. (Systemischer Carnitinmangel) S.45
5.2. Kind P.Sch. (Muskelcarnitinmangel) S.48
5.3. Patient T.H., Patient U.S. (Muskelcarnitinmangel) S.51

E DISKUSSION

1. Vorkommen von Carnitin im Körper, Allgemeines zur Funktion S.54

2. Metabolismus von Carnitin: Biosynthese, Resorption, Verteilung Aktiver Transport, Carnitingehalte in Muskel, Serum, Erythrocyten, Ausscheidung S.57

3. Rolle der Acylcarnitine in Gewebe und Plasma S.65

4. Geschlechtsunterschiede im Carnitinstoffwechsel, hormonelle Einflüsse S.68

5. Carnitinstoffwechsel in der Ketose S.70

6. Carnitinmangelsyndrome: Übersicht zu Klinik, Pathogenese, Diagnostik, Differentialdiagnose und Therapie S.73

ZUSAMMENFASSUNG S.89

LITERATURVERZEICHNIS

DANK

LEBENSLAUF

A. EINFÜHRUNG

L-Carnitin ((-)-ß-Hydroxy-γ-trimethylaminobutyrat) wurde 1905 von dem russischen Chemiker Kremberg in Fleischextrakt entdeckt. 1927 konnte die vom Entdecker bereits vorgeschlagene Struktur (Fig.1) gesichert werden (43).

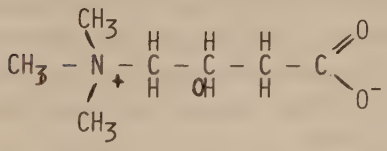

Fig.1: Strukturformel von Carnitin

1957 zeigten Fraenkel und Friedman (41) die Rolle von Carnitin als essentieller Wachstumsfaktor für Larven des Mehlwurms Tenebrio molitor und gaben damit einen ersten Hinweis auf seine biologische Bedeutung.

Außerdem konnte Fraenkel die erste Bestimmungsmethode für Carnitin, den Bioassay mit Tenebrio molitor erarbeiten. Erst seit 1955 wurde jedoch mit den Arbeiten von Fritz (44), (45), (46) die Rolle von Carnitin im Säugetierstoffwechsel deutlich. Fritz konnte zeigen, daß das Vorhandensein von Carnitin essentiell für die ß-Oxidation langkettiger Fettsäuren in den Mitochondrien ist. In der Folge dieser Entdeckung wurde die Rolle von Carnitin und der Carnitin-Acyl-Transferasen für zahlreiche Regulationsvorgänge in verschiedenen Organen, so etwa Leber, Muskel und Herzmuskel, ausführlich untersucht. Seitdem Engel und Angelini (37) 1973 eine Lipidspeichermyopathie ursächlich auf einen verminderten Carnitingehalt des Muskels zurückführen konnten, hat Carnitin auch klinisches Interesse gefunden. Die Bestimmung von Carnitin und der Aktivität der Carnitin-Acyl-Transferasen beginnt, als diagnostische Methode für die Abklärung metabolischer Myopathien Bedeutung zu erlangen.

Neben dem bereits genannten mikrobiologischen Verfahren (41) zur Carnitinbestimmung, das nur relativ schlecht reproduzierbare und vor allem wenig empfindliche Messungen erlaubte, ist die wichtigste Methode zur Bestimmung von Carnitin das von Marquis und Fritz (69) entwickelte enzymatische Verfahren, bei welchem Carnitin mit AcetylCoA und dem Enzym Carnitin-Acetyl-Transferase zu Acetyl-Carnitin umgesetzt wird und CoA frei wird.

Dieses freigesetzte CoA läßt sich etwa mit dem SH-Gruppenreagenz Dithionitrobenzoat (DTNB) optisch nachweisen. Bei diesem Verfahren, das in der Originalvorschrift mit relativ großen Probenmengen arbeitet und damit für eine Serumbestimmung oder die Analytik kleinster Gewebemengen, wie sie etwa in Biopsien anfallen, nicht geeignet ist, stören außerdem eventuell vorliegende SH-Gruppen, die unspezifisch mit dem Farbreagenz reagieren. Die Autoren schlagen vor, durch kurzes Kochen mit KOH diese SH-Gruppen zu oxydieren, wobei jedoch in einem nicht näher faßbaren Ausmaß veresterte Acylcarnitine hydrolysiert werden, und Gehalte an freiem Carnitin folglich nicht eindeutig zu messen sind. Modifikationen dieses Verfahrens, etwa von Cederblad und Lindstedt (22), Böhmer et al (8) sowie Mc Garry und Foster (65) setzen ein am Acetylrest radioaktiv markiertes AcetylCoA ein und weisen Acetylcarnitin nach, das jedoch relativ schwierig abzutrennen ist. Außerdem stört bei diesem Verfahren das in der Probe vorhandene Acetylcarnitin durch Hemmung der Carnitinacetyltransferase, und die Eichkurven lassen sich nur schwer linear erhalten. Dazu machen diese Verfahren das Arbeiten mit langlebigen Radionukliden, mit den bekannten, damit verbundenen Problemen nötig.

Meine Aufgabe im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestand darin, zunächst das Verfahren von Marquis und Fritz,

später modifiziert von Pearson und Tubbs (78) an kleinere Probenmengen zu adaptieren und außerdem die Störung durch SH-Gruppen zu beseitigen.
Mit dem erarbeiteten Verfahren waren dann Carnitingehalte in Serum, Blutzellen und Muskelgewebe von gesunden Probanden als Referenzwert zu bestimmen. Diese Werte konnten mit der verwendeten Methode sowohl für freies Carnitin als auch für kurzkettiges Acylcarnitin bestimmt werden, wodurch sich Veränderungen im Verhältnis dieser beiden Carnitinfraktionen untersuchen ließen, während in der bis dahin bekannten Literatur vorwiegend freies Carnitin mit einem nicht näher bestimmbaren Anteil von durch Teilhydrolyse freigesetztem Acylcarnitin gemessen wurde. Weiter sollte untersucht werden, welchen Einflüssen der Serumcarnitinspiegel normalerweise unterliegt, um sie bei der Interpretation von Carnitinbefunden berücksichtigen zu können. Schließlich sollte an Muskelbiopsieproben und Blutproben von Patienten mit Verdacht auf das Vorliegen einer metabolischen Myopathie durch Messung der Carnitingehalte und der Carnitinpalmitoyltransferase abgeklärt werden, ob der Erkrankung eine Störung des carnitinabhängigen Fettsäurestoffwechsels zugrundeliegt.

B. MATERIALIEN UND GERÄTE

L-Carnitin, Acetyl-D,L-Carnitin, Palmitoyl-L-Carnitin, S-Palmitoyl-CoA, HEPES: Sigma, St.Louis, USA; Rinder Serumalbumin: Behringwerke, Marburg; Labtrol-Kontrollserum: Merz+Dade, München; DTNB, SEC-23: Serva, Heidelberg; Dextran T 25o, Sephadex G 25, Ficoll-Paque: Pharmacia, Uppsala, Schweden; Heparin-Na: Nordmark-Werke, Hamburg; Lubrol WX: ICI, Frankfurt/M.; alle übrigen Biochemikalien: Boehringer, Mannheim; alle übrigen anorganischen p.a. Chemikalien: Merck, Darmstadt.

Glas/Teflon-Homogenisator, Dismembrator: Braun, Melsungen; Homogenisator-Antriebsmotor: Typ RW 18, Janke und Kunkel, Staufen/Brg.; Zentrifuge Rotanta S, Hettich, Tübingen; Kühlzentrifuge: Sorvall RC 2 B, Superspeed, Ivan Sorvall Inc, Norwalk, Conn., USA; Tisc hzentrifuge 32oo, Thermostat-Block 3401, Mikroliter-Pipetten, Photometer 1101 M mit Schreiber 6511: Eppendorf-Gerätebau, Hamburg; Thermostat f. Photometer: Haake, Berlin; Coulter-Counter: Coulter, Krefeld;
Analysenwaage: Mettler H 20 T, Spoerhase, Giessen;pH-Meter: Radiometer, Kopenhagen, Dänemark;

VERWENDETE ABKÜRZUNGEN:

CAT:	Carnitin-Acetyl-Transferase
CK:	Creatinkinase
CoA:	Coenzym A
DTNB:	5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoat)
EDTA:	Ethylendiamintetraacetat
EMG:	Elektromyogramm
HEPES:	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2 -ethansulfonsäure
ß-HOB:	ß-Hydroxybutyrat
LDH:	Lactatdehydrogenase
HKT:	Hämatokrit
NCP:	Non-Collagen-Protein
SEC:	Sulfethycellulose
Tris:	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
GOT:	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase

C. Methoden

1. Probennahme und Probenvorbereitung

1.1. Muskelbiopsien

1.1.1. Muskelproben wurden nach entsprechender Indikation in offener Biopsietechnik gewonnen und unmittelbar nach Entnahme in flüssiger Luft eingefroren. Die gefrorenen Muskelproben wurden bis zur Aufarbeitung bei -8o°C gelagert.

1.1.2. Aufschluß
Die gefrorenen Muskelproben (etwa 1oo bis 15o mg) wurden eingewogen und in gefrorenem Zustand mit dem Dismembrator (Braun, Melsungen) 2o Sekunden bei maximalem Ausschlag pulverisiert. Das so erhaltene, tiefgefrorene Gewebspulver wurde dann möglichst vollständig in einen 1 ml-Glashomogenisator (Braun, Melsungen) überführt und im 1o-fachen Volumen Aufschlußmedium (o,15 M KCl, 5o mM HEPES, 1 mM EDTA, pH 7,5) im Eisbad 6o Sekunden lang homogenisiert.

1.2. Serum, Plasma

Venenblut wurde bei Raumtemperatur bis zur Gerinnung stehengelassen und dann 15 Minuten bei 12oo g (Hettich, Rotanta S, 3ooo rpm) zentrifugiert, das Serum abgehebert.
Zur Gewinnung von Plasma wurde Venenblut in eine mit Heparin-Natrium benetzte Spritze abgenommen. Das Blut wurde sofort nach Entnahme wie oben zentrifugiert und das Plasma isoliert.

Plasma und Serum wurden, falls sie nicht gleich weiter verarbeitet werden konnten, bei -15°C eingefroren.

1.3. Leukocyten (nach Lipschitz et al, (63))

1.3.1. Mononukleäre Zellen

7o bzw. 5o ml heparinisiertes Venenblut wurden in 1o Portionen zu je 7 bzw. 5 ml auf jeweils 3 ml Ficoll- Paque mit der Dichte 1,o77 g pro cm^3 (nach (13)) in Kunststoffzentrifugengläschen aufgeschichtet und 35 Minuten bei 4oo g (Hettich Rotanta S, 18oo rpm) bei Raumtemperatur zentrifugiert. Danach wurde das die mononukleären Zellen enthaltende "buffy coat" mit einer Kunststoffspritze aufgezogen und auf 24 bzw. 18 Zentrifugenröhrchen verteilt, mit einem Waschmedium (o,9 % Natriumchlorid, 2o mM Phosphat; pH 7,4) auf je 1o ml aufgefüllt und 3o Minuten bei 8oo g (24oo rpm) zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde einmal wiederholt, die sedimentierten Zellen dann vereinigt und in ca. 1 ml Medium aufgenommen. Diese Suspensionen enthielten 51,8 x $1o^6$ (Versuch I) bzw. 29,2 x $1o^6$ (Versuch II) Zellen pro ml (Coulter Counter). Ausstriche auf Serum-vorbeschichteten Objektträgern zeigten in der May-Grünwald-Färbung fast ausschließlich Monocyten und Lymphocyten, nur vereinzelt Granulocyten und keine Erythrocyten.

1.3.2. Granulocyten

Das Sediment der ersten Zentrifugation (siehe 1.3.1.) wurde vom Überstand weitgehend befreit, im doppelten Volumen einer Lösung von 3 % Dextran T25o medium in o,9 %iger Natriumchloridlösung suspendiert und in spitzen Zentrifugengläsern 3o Minuten bei Raumtem-

peratur sedimentieren gelassen. Der Überstand wurde mit dem doppelten Volumen o,87 %iger NH_4Cl-Lösung verrührt und 2o Minuten stehengelassen, wobei die restlichen Erythrocyten zerstört wurden. Nach dem Abzentrifugieren bei 25o g (Hettich Rotanta S, 13oo rpm) wurde das Sediment einmal mit dem oben beschriebenen Waschmedium gewaschen und schließlich in o,7 bzw. 1,2 ml Medium aufgenommen. Diese Suspensionen enthielten 131 bzw. 39 x $1o^6$ Zellen pro ml (Coulter Counter), im Ausstrich fanden sich in der May-Grünwald-Färbung fast ausschließlich Granulocyten.

1.3.3. Thrombocyten (nach Vollset, Farstad (96))
15 ml Venenblut wurden sofort in ein Kunststoffzentrifugenröhrchen gegeben, in dem 4o mg EDTA vorgelegt waren und 6 Minuten bei 4°C bei 15oo g (Sorvall RC2B, SS34 Rotor, 35oo rpm) zentrifugiert. Der Überstand wurde 15 Minuten bei 3ooo g (5ooo rpm) zentrifugiert und das Sediment dieser Zentrifugation in ca. 1o ml Isolationsmedium (13o mM NaCl, 12 mM HEPES, 2,o mM EDTA, o,1 % Rinderserum-Albumin; pH 7,4) suspendiert. Diese Suspension wurde nochmals 15 Minuten bei 3ooo g zentrifugiert und das Sediment in o,6 ml Isolationsmedium resuspendiert. Zur Zählung wurde die Suspension 1 : 5oo verdünnt und in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Sie enthielt 4,8 x $1o^9$ Zellen pro ml. Es wurden außer Thrombocyten keine sonstigen Zellen gefunden.

1.4. Erythrocyten

1.4.1. Gewaschene Erythrocyten
Heparinisiertes Vollblut wurde bei Raumtemperatur 15 Minuten bei 12oo g (Hettich Rotanta S, 3ooo rpm) zentrifugiert, das Plasma abgehebert und das Sediment mit dem doppelten Volumen Waschmedium (o,9 % Natriumchlorid,

2o mM Phosphat; pH 7,4) dreimal gewaschen und jeweils 1o Minuten bei 12oo g (3ooo rpm) abzentrifugiert. Schließlich wurde das Sediment der dritten Wäsche im gleichen Volumen Waschmedium aufgenommen. Der Hämatokrit dieser Suspension wurde durch 5 minütige Zentrifugation bei 1o ooo g in einer heparinisierten Glaskapillare bestimmt, ferner wurden gegebenenfalls die Zellzahl, sowie der Hämoglobingehalt am Coulter Counter gemessen. Zur weiteren Reinigung der Erythrocyten wurde in einigen Fällen nach einem Verfahren von Nakao et al (75) ein ml der Suspension gewaschener Erythrocyten auf eine Säule mit 1 cm Durchmesser und einer Länge von ca. 5 cm aufgetragen, die mit einer Mischung aus 1 ml Sephadex G 25 und 1 ml Sulfethylcellulose (SEC)-23 beschickt und vorher mit Elutionsmedium (o,138 M NaCl, o,oo5 M $MgCl_2$, o,o1 M Kaliumphosphat, 1o Einheiten Heparin pro ml; pH 7,42) äquilibiriert worden war. Die Erythrocyten wurden mit 5 ml Elutionsmedium eluiert, 5 Minuten bei 12oo g (Hettich Rotanta S, 3ooo rpm) zentrifugiert und in 1 ml Medium aufgenommen. Hämatokrit, Zellzahl sowie Hämoglobingehalt der Suspension wurden, wie oben angegeben, bestimmt. In der May-Grünwald-Färbung dieser Suspension waren keine Leukocyten mehr nachzuweisen. Gleiche Ergebnisse bezüglich der Reinheit der Erythrocyten wurden erzielt, wenn statt der gewaschenen Erythrocyten eine gleiche Menge heparinisiertes Vollblut auf die Säule aufgetragen wurde.

1.4.2. Erythrocytenmembranen

Erythrocyten wurden, wie oben beschrieben, vom Heparinplasma abgetrennt, und dreimal mit einem Waschmedium (o,9 % Natriumchlorid, 1o mM Phosphat; pH 7,4) gewaschen und jeweils 1o Minuten lang bei 12oo g zentrifugiert.

Das Sediment der letzten Zentrifugation wurde mit dem genau dreifachen Volumen eines hypotonen Lysemediums (o,o23 % NaCl, o,o5 mM Phosphat, pH 7,4) versetzt und das dabei entsthende klare Hämolysat bei o bis 4°C 35 Minuten bei 2o ooo g (Sorvall RC2B, SS34 Rotor, 13 ooo rpm) zentrifugiert. Nach Abtrennen des Überstandes wurde das Sediment mit etwa 2o ml des gleichen Lysepuffers versetzt, gut gemischt und wie oben zentrifugiert. Diese Prozedur wurde so oft wiederholt, bis der Überstand keine sichtbare Rotfärbung mehr aufwies und das Sediment ebenfalls farblos war. In der Regel waren hierfür drei bis vier Waschgänge notwendig. Die Zellzahl des Sediments der letzten Zentrifugation wurde am Coulter-Counter nach Wiederaufnehmen in o,9 %iger Natriumchloridlösung bestimmt, der Proteingehalt nach der Methode von Lowry gemessen.

2. Carnitinbestimmung

L-Carnitin wurde modifiziert nach dem Verfahren von Marquis und Fritz (69) bestimmt. Die Bestimmung beruht auf der Übertragung des Acetylrestes von AcetylCoA auf freies Carnitin durch das Enzym Carnitin-Acetyl-Transferase (CAT), wobei das freiwerdende CoA-SH mit dem farbgebenden SH-Gruppen-Reagenz 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) bei 4o5 nm fotometrisch verfolgt wird (s. Fig.2).

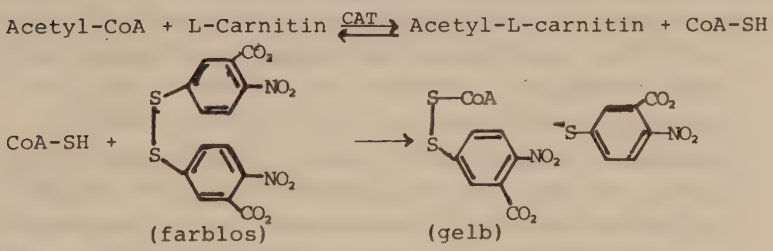

Fig.2: Reaktionsschema

Im Extrakt vorliegende, durch Reaktion mit DTNB störende SH-Gruppen werden vorher durch Zugabe von H_2O_2 oxidiert und das überschüssige H_2O_2 mit Katalase entfernt.

Bestimmt werden mit diesem Test freies L-Carnitin, sowie, nach alkalischer Hydrolyse der Extrakte, das gesamte in Perchlorsäure lösliche Carnitin, das hier als "(säurelösliches) Gesamtcarnitin" bezeichnet wird. Die Differenz zwischen Gesamtcarnitin und freiem Carnitin entspricht den säurelöslichen, kurzkettigen Acylcarnitinderivaten, deren größten Anteil Acetylcarnitin ausmacht (hierzu siehe D 3.).

2.1. Herstellung der eiweißfreien Extrakte

Bei Muskelhomogenaten, Serum und Plasmaproben wurden 2oo µl Probe mit dem gleichen Volumen 1,2 M Perchlorsäure gemischt, bei Raumtemperatur stehengelassen und nach 1o Minuten in der Eppendorf-Tischzentrifuge 2,5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig abgehebert und gesammelt, der Niederschlag dreimal mit 1oo µl o,6 M Perchlorsäure nachgewaschen und zentrifugiert. Alle Extrakte wurden vereinigt und das Gesamtvolumen durch Wägung und Berechnung unter Zugrundelegung einer geschätzten Dichte von 1,6 g/cm³ bestimmt.
Bei Vollblut und Erythrocytensuspensionen mit einem Hämatokrit von ca. o,3o bis o,45 wurden Proben von 3oo µl mit 2oo µl 1,2 M Perchlorsäure extrahiert und dann wie oben nachextrahiert. Leukocytensuspensionen sowie andere Proben mit sehr geringem L-Carnitingehalt wurden in Mengen von 5oo µl mit 25 µl 12 M Perchlorsäure enteiweißt und nur einmal mit 1oo µl o,6 M Perchlorsäure nachextrahiert.

Zur Neutralisation wurden zu 6oo µl Perchlorsäureextrakt 5o µl 1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 6,5 zugesetzt und dann vorsichtig mit 1 M KOH auf pH 6,5 bis 7,o gebracht, wozu ca. 35o bis 37o µl KOH benötigt wurden. Nach mindestens 5o-minütigem Stehen im Eisbad, um das gebildete Perchlorat möglichst weitgehend auszufällen, wurde der Niederschlag abzentrifugiert, der Überstand wurde zur Carnitinbestimmung eingesetzt.

2.2. Hydrolyse der Carnitinester (Gesamtcarnitin)

Zu 2oo µl des neutralisierten Extraktes (siehe 2.1.) wurden 5o µl 1N KOH gegeben und 1 Stunde bei 56°C inkubiert. Danach wurde im Eisbad mit Perchlorsäure wieder neutralisiert und nach 1o Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Carnitinbestimmung eingesetzt. Vorversuche hatten gezeigt, daß die Hydrolyse unter diesen Bedingungen vollständig war.

2.3. Fotometrischer Test

2.3.1. Vorbehandlung zur Entfernung störender SH-Gruppen

2oo µl neutraler Extrakt, vor oder nach Hydrolyse, wurden bei Raumtemperatur in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 1o µl 3%igem H_2O_2 (Perhydrol, Merck 1 : 11 verdünnt mit 5o mM HEPES-Puffer), 5 µl DTNB (4 mg/ml in 5o mM HEPES) und 2o µl o,5 M HEPES (enthaltend 1o mM EDTA; pH 7,5) gut gemischt und 1o Minuten stehengelassen. Bis dahin war eine, vor allem in Erythrocytenextrakten, etwa zu beobachtende

Gelbfärbung bei DTNB-Zugabe vollständig verschwunden. Dann wurden 5 µl Katalase (Boehringer, 1,3 Millionen Einheiten pro ml, hundertfach mit 5o mM HEPES verdünnt) zugegeben und die Reaktionsgefäße offen stehengelassen, bis nach ca. 3o bis 4o Minuten keine Blasen mehr aufstiegen.
Die Verwendung von HEPES-Puffer anstelle des in der früheren Literatur angegebenen Tris geschah aufgrund einer Beobachtung von Christiansen und Bremer (29), wonach das Enzym CAT mit AcetylCoA auch Tris acetylieren und so zu verfälschenden Testergebnissen führen kann. Dies ist mit dem verwendeten HEPES-Puffer nicht der Fall.

2.3.2. 2oo µl vorinkubierter Extrakt wurden dann in eine 25o µl Glasmikroküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm gegeben, 5 µl Acetyl-CoA-Lösung (3,7 mM in H_2O) zugegeben und im Fotometer bei 25°C, 4-facher Spreizung bei 4o5 nm der Vorlauf über ca. 5 Minuten bis zur Konstanz verfolgt. Dann wurde mit 5 µl Carnitinacetyltransferaselösung gestartet.(Die Enzymlösung wurde hergestellt durch kurzes Abzentrifugieren der Enzymsuspension der Firma Boehringer (4oo Einheiten pro ml) in der Eppendorf-Tischzentrifuge, Abhebern des Überstandes und Wiederauflösen des Sediments im 7,5-fachen Volumen 5o mM HEPES-Puffer, pH 7,5). Der Test wurde bis zur Konstanz verfolgt (siehe Fig.3).

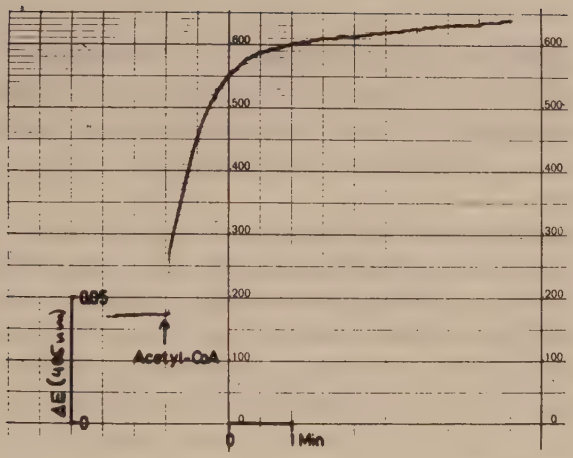

Fig.3: Carnitinbestimmung, Testverlauf (s.2.3.2.)

Zur Berechnung wurde bei nichthorizontalem Endverlauf gegebenenfalls auf die Zeit der Enzymzugabe extrapoliert, der Vorlauf abgezogen und unter Zugrundelegung des molaren Extinktions-Koeffizienten ε = 13,6 x 10^{-3} $cm^2/\mu Mol$ für 405 nm (66) der Gehalt der Probe an L-Carnitin in nmol/ml errechnet. Extrakte von Muskelproben mit normalem L-Carnitingehalt konnten vor der Bestimmung 1:2 mit H_2O verdünnt und bei nur 2-facher Spreizung des Fotometerschreibers gemessen werden.

2.4. Wiederfindung von L-Carnitin und Acetylcarnitin aus Serum und Muskelhomogenat

In 200 µl Serum wurde nach Zugabe von 30 µl einer 0,413 mM D,L-Carnitin- Standardlösung (entsprechend 6,2 nMol L-Carnitin) bei Durchführung der üblichen Be-

stimmung 6,3 nMol (1o2 %) wiedergefunden. Bei Zugabe von 1o µl einer o,44o nM Acetyl-D,L-Carnitin-Standardlösung, entsprechend 2,3 nMol Acetyl-L-Carnitin, fanden sich bei üblicher Bestimmung nach Hydrolyse 2,3 nMol (1o5 %) wieder.
Zu 1 ml Muskelhomogenat (siehe 1.1.2.) wurden 2oo µl einer o,548 mM L-Carnitin-Standardlösung, entsprechend 1o9,6 nMol L-Carnitin, zugegeben, wovon sich bei üblicher Bestimmung 1o8,3 nMol (98%) wiederfanden. Bei Zugabe von 2oo µl einer o,213 mM Acetyl-D,L-Carnitin-Standardlösung, entsprechend 42,6 nMol L-Carnitin zu 1 ml Homogenat wurden nach üblicher Bestimmung 36,7 nMol (86 %) wiedergefunden.

2.5. Reproduzierbarkeit

Die Ergebnisse der Carnitinbestimmung in Serie (n=8, Doppelwerte) bzw. an 6 aufeinanderfolgenden Tagen sind in Tabelle 1 und 2 aufgeführt.

2.6. Verwendbarkeit von Plasma

Ein Vergleich der L-Carnitinbestimmung aus Serum und Heparin-Plasma derselben Blutprobe ergab eine gute Übereinstimmung der Werte (siehe Tabelle 3).

2.7. Haltbarkeit der Proben

2.7.1. Muskelproben

In einer menschlichen Muskelbiopsie wurde der L-Carnitingehalt zweimal im Abstand von mehr als 4 Monaten

währenddessen die Probe bei -8o°C gelagert war, bestimmt. Es ergab sich eine geringe Abnahme des Gehaltes an freiem Carnitin und Gesamtcarnitin von 9 bzw. 8 %.

2.7.2. Serum

Eine Serumprobe wurde unmittelbar nach Serumgewinnung sowie nach 11 Tagen bei verschiedenen Temperaturen und Lagerungsbedingungen untersucht. Dabei fanden sich, unabhängig von den Lagerungsbedingungen nur geringfügige Unterschiede im Carnitingehalt (siehe Tabelle 4). Dasselbe gilt für den neutralisierten Perchlorsäureextrakt.

Tabelle 1: Serumcarnitinbestimmung in Serie (Doppelwerte)

Probe No	1	2	3	4	5	6	7	8	$x \pm s$	VK
Freies Carnitin	33,5	34,5	37,5	37,9	36,4	35,9	33,5	35,2	35,6±1,7	5%
Gesamtcarnitin	47,6	49,9	49,0	46,2	46,3	47,5	45,4	46,4	47,3±1,5	3%
Kurzkettiges Acylcarnitin	14,1	15,4	11,7	8,3	9,9	11,6	11,9	11,2	11,8±2,2	19%

Carnitinkonzentration in µmol/l
Bestimmung jeweils in Doppelwerten

Tabelle 2: Serumcarnitinbestimmung an 6 aufeinanderfolgenden Tagen

Probe No	1	2	3	4	5	6	$\bar{x} \pm s$	VK
Freies Carnitin	46,4	45,6	48,1	51,0	46,6	42,5	46,7±2,8	6%
Gesamtcarnitin	65,3	68,6	67,2	72,4	67,9	65,0	67,7±2,7	4%
Kurzkettiges Acylcarnitin	18,9	23,0	19,1	21,4	21,3	22,6	21,1±1,7	8%

Carnitinkonzentration in µmol/l
Bestimmung jeweils in Doppelwerten, wie in C 2 beschrieben

Tabelle 3: Carnitinbestimmung aus Serum und Heparinplasma

	Serum	Plasma
Freies Carnitin	8,5; 9,2	9,4; 9,0
Gesamtcarnitin	1o,9;11,2	1o,9;10,5
Kurzkettiges Acylcarnitin	2,4; 2,o	1,5; 1,5

Carnitin in nmol pro 2oo µl Probe
Bestimmungen jeweils in Doppelwerten; Methodik s. C 1.2.und 2.

Tabelle 4: Stabilität von Carnitin in Serum und neutralisiertem Perchlorsäureextrakt

	Serum					Extrakt	
	frisch (1)	nach 11 Tagen (2)	(3)	(4)	(5)	frisch (1)	nach 11 T. (2)
Freies Carnitin	7,1	6,2	6,5	6,3	6,7	8,5; 9,2	9,0; 9,5
Gesamtcarnitin	9,5	9,0	8,7	9,3	9,2	10,9;11,2	11,4;11,2
Kurzkettiges Acylcarnitin	2,4	2,8	2,2	3,o	2,6	2,4; 2,o	2,4; 1,7

(1) siehe C 1.2. und C 2.
(2) bei - 18°C
(3) bei - 18°C, 2x getaut und wieder eingefroren
(4) bei + 4°C
(5) bei + 25°C

Carnitingehalt von 2oo µl Probe in nmol

3. Carnitin-Palmitoyl-Transferase (CPT) in Muskelproben

Der Bestimmung liegt die Übertragung des Palmitoylrestes von Palmitoyl-CoA auf L-Carnitin unter der Wirkung der Carnitinpalmitoyltransferase (CPT) zugrunde, wobei die Freisetzung von CoA-SH mit dem farbgebenden SH-Gruppen-Reagenz DTNB fotometrisch verfolgt wird (siehe Fig.4).

$$\text{Palmitoyl-CoA} + \text{L-Carnitin} \overset{\text{CPT}}{\rightleftharpoons} \text{Palm.-Carnitin} + \text{CoA-SH}$$

$$\text{CoA-SH} + \text{DTNB} \longrightarrow \text{Gelber Farbstoff (S. Fig.2)}$$

Fig.4: Reaktionsschema der CPT-Bestimmung

3.1. Anreicherung der Enzymaktivität aus Muskelhomogenat

Zunächst wurde nach einem Verfahren von Di Mauro, Melis Di Mauro (34) jeweils ein Aliquot von 5oo bis 7oo µl Muskelhomogenat (Herstellung siehe 1.1.2.)

bei o bis 4°C 15 Minuten bei 1ooo g zentrifugiert (Sorvall RC2B, SS34 Rotor, 3ooo rpm), der Überstand vollständig abgehebert und 35 Minuten bei 15 ooo g (11 ooo rpm) zentrifugiert. Das Sediment wurde in 2oo bis 3oo µl 5o mM HEPES-Puffer, pH 7,5 aufgenommen und im Glas/Teflon-Homogenisator von Hand homogenisiert. Der Proteingehalt dieser Homogenate betrug ca. o,5 mg/Protein/ml.

Da sich bei diesem Präparationsverfahren zeigte, daß im Sediment der ersten Zentrifugation bei 1ooog ein erheblicher Teil der Enzymaktivität verlorenging, wurde der Anreicherungsgang später wie folgt geändert:

Ein Aliquot von mindestens 2oo µl Muskelhomogenat wurde zuerst bei o bis 4°C bei 8ooo g (8ooo rpm) zentrifugiert, wonach sich keine Aktivität mehr im Überstand fand. Das Sediment dieser Zentrifugation wurde im halben Ausgangsvolumen des KCl-Muskelaufschlußmediums, das zusätzlich o,2 % Lubrol als Detergenz enthielt, 12o Sekunden im Glas/Teflon-Homogenisator mit 1ooo rpm homogenisiert (Eisbad) und dann 5 Minuten bei 8oo g (25oo rpm) zentrifugiert. Der Überstand mit einem Proteingehalt zwischen 2 und 3 mg/ml wurde dann für die Enzymbestimmung eingesetzt. Bei diesem Anreicherungsverfahren fanden sich nur noch etwa 2o % der Gesamtaktivität des Ausgangshomogenats im Sediment der zweiten Zentrifugation bei 8oo g.

Ein Vergleich der Enzymaktivitäten beim Aufschluß des Muskels im Glas/Teflon-Homogenisator und durch Pulverisieren des tiefgefrorenen Muskels mit dem Dismembrator ergab keinen Unterschied.

Beim Einsetzen von frischem Rattenmuskel ergab sich beim Dismembrator-Aufschluß gegenüber gefrorenem Rattenmuskel eine um etwa 25% erhöhte Aktivität des Enzyms.

3.2. Fotometrische Bestimmung der Carnitinpalmitoyltransferase (modifiziert nach Harano et al, (5o))

Ein frisch bereitetes Testgemisch bestand aus 1,5 ml 5o mM HEPES-Puffer, pH 7,5, 5o µl DTNB-Lösung (1 mg/ml) in 5o mM HEPES und 5o µl 2o mM EDTA-Lösung in 5o mM HEPES.
In eine Mikroküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm wurden pipettiert: 2oo µl Testgemisch, 1o bis 5o µl Probe (1o bis 3o µg Protein/Ansatz nach altem Aufschlußverfahren bzw. 2o bis 5o µg Protein/Ansatz nach neuem Aufschluß), 5 µl Rinderserumalbuminlösung (5o mg/ml in 5o mM HEPES-Puffer) sowie 1o µl Palmitoyl-CoA-Lösung (2 mM in H_2O).
Bei einer Temperatur von 25°C wurde der zunächst rasche Vorlauf bis zur Abflachung und Konstanz nach etwa 6 bis 8 Minuten verfolgt, und sodann die Reaktion durch Zugabe von 1o µl L-Carnitinlösung (ca. o,25 M in HEPES-Puffer, pH 7,5) gestartet (siehe Fig.5).

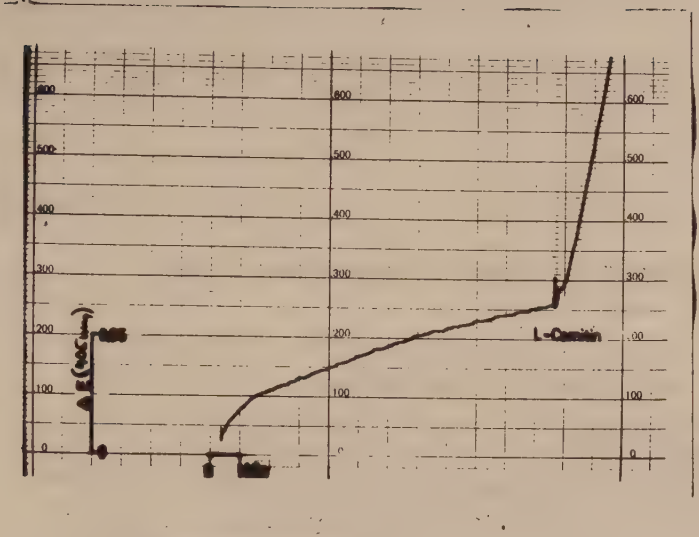

Fig.5: CPT-Testverlauf

Zur Auswertung wurde die Extinktionszunahme bei 4o5 nm und 4-facher Spreizung der Schreiberskala vor und nach Carnitinzugabe bestimmt und aus der Extinktionszunahme/Minute nach Abziehen des Vorlaufes die Aktivität des Enzyms errechnet. Dabei entspricht eine Milli-Einheit der Bildung von 1 nMol Palmitoylcarnitin/Minute. Durch Division durch den Proteingehalt der Enzymsuspension läßt sich hieraus die spezifische CPT-Aktivität in Einheiten/g Protein erhalten.

4. Bestimmung von "Non-Collagen-Protein" (NCP)

Zur Bestimmung von "Non-Collagen-Protein" (NCP) nach Lilienthal et al (61) wurden 1o µl Muskelhomogenat in 1oo µl 5o mM NaOH suspendiert und über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach wurde in der Eppendorf-Tischzentrifuge 2 Minuten zentrifugiert und vom klaren Überstand wurden 2o bis 4o µl für die Proteinbestimmung nach Lowry et al (64) eingesetzt. Rinderserumalbumin diente als Standard. Die gefundenen Proteingehalte änderten sich nicht, wenn die Inkubationszeit zwischen 12 und 36 Stunden variiert wurde.

D. ERGEBNISSE

1. Carnitingehalte in geformten Blutbestandteilen

Tabelle 5 zeigt die Verteilung von freiem Carnitin, Gesamtcarnitin und kurzkettigem Acylcarnitin in den geformten Blutbestandteilen, wie sie aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Fraktionierungen (Versuche 1 und 2) gefunden wurde. Aus ihr ist ersichtlich, daß etwas weniger als die Hälfte des im Vollblut nachzuweisenden Carnitins aus den Zellen stammt. Mononukleäre Zellen und Granulocyten haben einen Gehalt in etwa der gleichen Grössenordnung von 1oo bis 2oo µMol Carnitin/$1o^{12}$ Zellen, wobei der Gehalt von freiem Carnitin, Gesamtcarnitin sowie an säurelöslichen Acylcarnitinen in mononukleären Zellen um etwa das Zweifache höher liegt als in Granulocyten. Für diese Ergebnisse ließen sich bisher keine vergleichbaren Literaturwerte finden. Die Gehalte der Leukocyten liegen um etwa das Zwanzig- bis Dreißigfache über dem der Erythrocyten.

Tabelle 5: Verteilung von Carnitin im Vollblut

	Freies Carnitin	Gesamtcarnitin	Kurzk. Acylcarnitin
Vollblut (1)	- 36.3	- ; 53,5	- ; 17,2
Plasma (2)	38.9; 42,8	54,3; 53,6	15,4; 1o,8
Granulocyten (3)	113; 116	136; 171	22; 55
Mononukleäre Zellen (3)	218; 175	338; 257	12o; 82
Erythrocyten (4)	- ; 2,9	- ; 5,1	- ; 2,3

(1) Heparinblut; Gewinnung siehe C 1.2. NKT: o,44;o,45 Erythrocyten: 5,25;5,14 Zellen x $1o^{12}$/l Leucocyten: 12,7;8,25 Zellen x $1o^{12}$/l

(2) Heparinplasma, siehe C 1.2.
(3) siehe C 1.3.1. bzw. C 1.3.2.
(4) dreimal gewaschene Erythrocyten, siehe C 1.4.1.; im ersten Versuch keine Carnitinbestimmung durchgeführt im zweiten Versuch: MCV: 0,52; 5,89 x $1o^{12}$ Erythrocyten/l; 4.0 x 10^9 Leucocyten/l

Carnitingehalt in µmol/l Vollblut bzw. Plasma und µmol/10^{12} Zellen; Methodik siehe C 2.; Ergebnisse aus 2 Vers.

Trotzdem können sie wegen ihrer relativ geringen Anzahl im Vergleich zu diesen nicht wesentlich zum Carnitingehalt des Vollblutes beitragen. In angereicherten Thrombocyten (siehe Methodenteil) ließ sich mit unserer Methodik kein Carnitin nachweisen, ihr Gehalt liegt also sicher unter 1 nMol/$1o^9$ Zellen.

Reinigt man Erythrocytensuspensionen über eine Sulfethylcellulose/Sephadex-Säule (siehe Methodenteil), wonach sie praktisch leukocytenfrei sind, so verringert dies den Carnitingehalt nur um etwa 4 %. Um vollends auszuschließen, daß der in Erythrocyten gemessene Carnitingehalt nur auf einer Verunreinigung mit restlichem Plasmacarnitin beruht, wurden die Suspensionen mehrfach gewaschen und Carnitin in den Überständen bestimmt (siehe Tabelle 6). Dabei blieb der Carnitingehalt der Zellen noch nach bis zu viermaligem Waschen konstant und im Überstand fand sich praktisch kein Carnitin. Erst nach hyopotoner Hämolyse der Erythrocyten taucht praktisch das gesamte in Erythrocyten vorliegende Carnitin im Lysat auf. In den gewaschenen Erythrocytenmembranen läßt sich fast kein Carnitin mehr nachweisen. Hieraus läßt sich folgern, daß Carnitin intracellulär in den Erythrocyten vorliegt, die damit für den überwiegenden Teil des cellulären Carnitingehaltes im Vollblut verantwortlich sind.

Aus Tabelle 5 ist ebenfalls ersichtlich, daß das Verhältnis von freiem Carnitin zu säurelöslichem Acylcarnitin in den Erythrocyten im Unterschied zu Plasma und Leukocyten fast 1 : 1 ist, d.h., daß relativ mehr kurzkettiges Acylcarnitin vorliegt. Die Tabelle 7 zeigt die Ergebnisse der Carnitinbestimmung in Suspensionen gewaschener Erythrocyten sowie im Plasma von acht gesunden Versuchspersonen. Dabei sind Carnitin und Acetylcarnitingehalte der Erythrocytensuspensionen über die Bestimmung des Hämatokrit auf die gepackten

Zellen umgerechnet. Der Wassergehalt dieser gepackten Erythrocyten wurde nach Natelson und Natelson (76) mit 7o % angenommen und hiermit die Carnitinkonzentration in µMol/l errechnet. Aus der Tabelle 7 läßt sich ersehen, daß der Gehalt an freiem Carnitin in den Erythrocyten in etwa der im Plasma vorliegenden Konzentration entspricht. Die Gesamtcarnitinkonzentration und damit die der kurzkettigen Acylcarnitine liegt dagegen deutlich über der entsprechenden Plasmakonzentration, woraus sich für die Acylcarnitine gegenüber dem Plasma ein Konzentrationsgradient von etwa 2 bis 4 ergibt. In der Diskussion wird auf diese Befunde noch näher eingegangen.

Tabelle 6: Carnitin in Erythrocyten (Auswaschversuch)

	Plasma	Überstand 1.	2.	3.	4.	Hämolysat	Erythrocyten nicht	1x	2x	3x	4x gew.
Freies Carnitin	32,2	2,7	4,3	3,7	5,6	14,0	9,8	12,0	10,6	13.3	8,0
Gesamtcarnitin	42,7	7,8	5,4	5,3	5,8	30,9	27,4	26,4	22,0	25,0	27,3
Kurzkettiges Acylcarnitin	10,5	5,1	1,1	1,6	0,2	16,9	17,6	14,4	11,4	11,7	19,3

Vollblut wurde 1o min bei 25°C mit 15oo g zentrifugiert, das Plasma abgehebert, ebenso wurde das oberste Drittel des Sedimentes entfernt. Danach wurde viermal mit jeweils dem selben Volumen 0,9%iger NaCl-Lsg.,10 mM Phosphat, pH 7,4, aufgefüllt und gut gemischt, dann wieder je 1o min zentrifugiert. Carnitin wurde, wie in C 2. beschrieben, aus den Überständen sowie den gesamten Suspensionen bestimmt und der Gehalt ist in µmol/l angegeben.
Der Zelluläre Carnitingehalt wurde aus der Differenz von Suspension und Überstand errechnet und ist in µmol pro 1 gepackte Zellen angegeben.

Tabelle 7: Carnitingehalt in Plasma und Erythrocyten gesunder Probanden

Proband:	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	$\bar{x} \pm s$	
Plasma:										
Freies Carnitin	44,1	43,7	42,8	61,0	27,3	39,1	38,4	19,3	39,5 ± 11,4	
Gesamtcarnitin	55,3	50,2	53,6	77,1	47,7	52,5	54,5	40,0	53,9 ± 10,6	
Kurzk. Acylcarn.	11,2	6,5	10,8	16,1	20,4	13,4	16,1	20,7	14,4 ± 4,9	
Kurzk. Acylcarnit. / Freies Carnitin	0,25	0,15	0,25	0,26	0,75	0,34	0,42	1,07	0,44 ± 0,31	
Erythrocyten:										
Freies Carnitin	41,3	38,7	46,7	59,4	34,3	45,4	27,5	29,7	40,4 ± 10,3	n.s.
Gesamtcarnitin	88,8	79,8	83,0	110,2	73,3	70,6	64.9	55,6	78,3 ± 16,6	***
Kurzk. Acylcarn.	47,5	41.1	36,3	50,8	39,0	25,2	37,4	25,8	37,9 ± 9,1	***
Kurzk. Acylcarnit. / Freies Carnitin	1,15	1,06	0,78	0,86	1,14	0,56	1,36	0,87	0,97 ± 0,25	**

Heparinisiertes Vollblut zentrifugiert und Plasma sowie dreimal gewaschene Erythrocyten extrahiert wie unter C 1.2.1. und C 1.4.1. beschrieben.
Angegeben sind µmol Carnitin/l; zur Berechnung für Erythrocyten siehe D 1.
* : $p \leq 0,01$; ** : $p \leq 0,005$; *** : $p < 0,0005$; n.s.: kein signifikanter Unterschied Erythrocyt-Plasma

2. Carnitin im Serum (Plasma)

2.1. Gesunde Versuchspersonen

Die Kontrollgruppe bestand aus 51 klinisch gesunden Erwachsenen im Alter von 2o bis 55 Jahren, mit einem Durchschnittsalter von 3o,7 Jahren. Hiervon waren 23 Männer im Alter von 2o bis 55 Jahren, im Durchschnitt 32,7 Jahre, und 28 Frauen im Alter von 2o bis 44 Jahren, im Durchschnitt 28,8 Jahre.
Von den weiblichen Versuchspersonen war keine zum Zeitpunkt der Probennahme schwanger. Keine Versuchsperson wies zum Zeitpunkt der Untersuchung Weichteilverletzungen auf. Aus den Daten der Tabelle 8a ergibt sich, daß die Normalbereiche für freies Carnitin und Gesamtcanitin im Serum bei Männern signifikant höher liegen als bei Frauen. Acetylcarnitin ist bei beiden Geschlechtern nicht signifikant verschieden. Diese Ergebnisse stimmen gut mit den von Cederblad (24) angegebenen Werten überein, während andere Autoren niedrigere Normalwerte und auch keine Geschlechtsunterschiede beobachteten (siehe Zusammenfassung bei Mitchell (72), sowie Tabelle 13). Dies beruht möglicherweise auf der Untersuchung kleinerer Kollektive.

2.2. Physiologische Schwankungen des Carnitinserumspiegels

Bei einer gesunden Versuchsperson wurden die Carnitinserumspiegel über 24 Stunden verfolgt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Fig.6 dargestellt. Demnach findet man im circadianen Verlauf nur geringe Schwankungen des freien Carnitinspiegels, dagegen stärker ausgeprägte Veränderungen des kurzkettigen Acetylcarnitins. Ein sicherer Zusammenhang des Carnitinspiegels mit der Nahrungsaufnahme läßt sich nicht erkennen.

Tabelle 8: Carnitin im Serum

	Freies Carnitin	Gesamtcarnitin	Kurzkettiges Acylcarnitin	Creatinin
a) Kontrollen				
Frauen (n=28)	36,9 ± 8,7***	47,9 ± 9,3***	11,2 ± 3,8n.s.	
	(19,3 bis 53,9)	(28,1 bis 66,4)	(4,3 bis 20,7)	
Männer (n=23)	49,3 ± 8,7	6o,4 ± 9,4	11,1 ± 3,8	
	(34,8 bis 69,5)	(44,2 bis 79,3)	(5,7 bis 21,4)	
b) Niereninsuffizienz				
(1)	59,6	72,1	12,5	1,2
(2)	52,2	65,0	12,2	6,2
(3)	38,1	50,1	12,0	5,2
(4)	47,6	66,7	19,1	1,2
(5)	55,3	65,0	9,7	1,4
(6)	55,9	61,6	5,7	1,0
(7)	56,2	80,0	23,8	9,8
(8)	60,2	86,2	26,0	1,8
(9)	78,1	91,0	12,6	2,0
(10)	87,4	104,2	16,8	2,1
$\bar{x}$ ± s	59,1 ± 14,2***	74,2 ± 16,1***	15,0 ± 6,3*	-
c) Fettsucht				
(1)	41,0	66,6	25,2	
(2)	54,2	73,7	19,5	
(3)	72,1	86,9	14,8	
(4)	57,4	78,8	21,4	
(5)	63,2	79,2	16,0	
(6)	50,7	66,9	16,2	
$\bar{x}$ ± s	56,4 ± 10,7***	63,9 ± 8,8***	18,9 ± 4,0***	

Zur Zusammensetzung der Untersuchten Gruppen siehe D. 2.1., 2.3., 2.4.;
Carnitinbestimmung, wie unter C 1.2. und 2. beschrieben, angegeben sind µmol Carnitin/l, Creatinin in mg/dl;
Signifikanz von Unterschieden zu den Kontrollen wurde mit dem t-Test für unverbundene Stichproben geprüft
n.s.: nicht signifikant; * : $p < 0,01$; ** : $p < 0,005$; *** : $p < 0,0005$

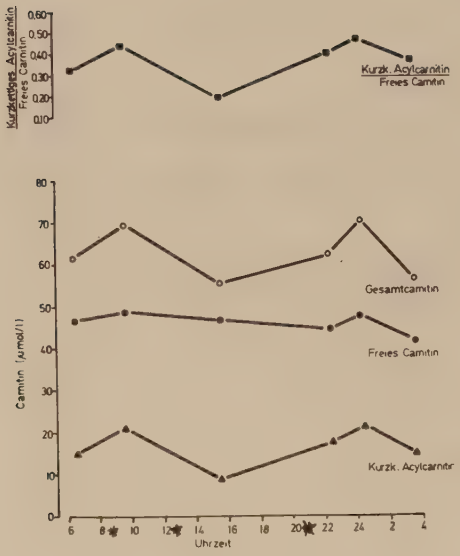

Fig.6: Tagesprofil des Serumcarnitinspiegels (* : Mahlzeiten)

Tabelle 9: Serumcarnitin im Verlauf mehrerer Monate

	Proband (1)					Proband (2)		Proband (3)	
	9.6.78	23.6.78	15.10.78	14.11.78	22.3.79	7.10.77	6.6.78	7.10.77	26.3.79
Freies Carnitin	37,6	44,1	36,3	38,9	41,4	62,6	60,7	34,8	43,7
Gesamtcarnitin	45,5	55,3	48,1	54,3	51,6	70,4	66,0	44,2	50,2
Kurzkettiges Acylcarnitin	7,9	11,2	11,8	15,4	10,2	7,8	5,3	9,4	6,5

Die Seren wurden bei -18°C eingefroren über die angegebenen Zeiten gelagert, dann, wie unter C 2. beschrieben, Carnitin bestimmt; angegeben sind µmol Carnitin/l

Bei drei gesunden Versuchspersonen wurden die Serumcarnitinspiegel zu verschiedenen weit auseinanderliegenden Zeitpunkten bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 9 zusammengestellt, aus der ersichtlich ist, daß sich nur sehr geringe Schwankungen zeigen, die zum Teil innerhalb der Meßungenauigkeit bleiben.

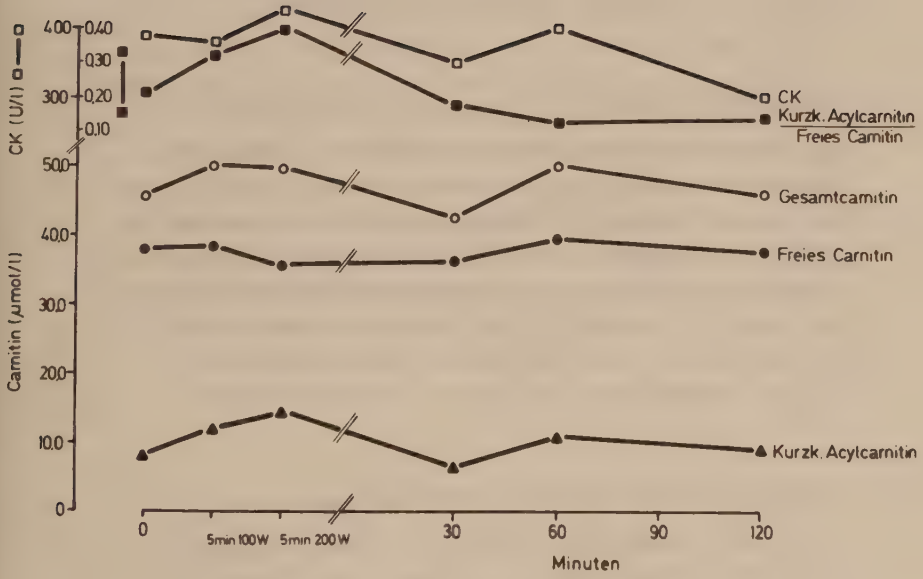

Fig.7: Serumcarnitinspiegel und Creatinkinase (CK) im Serum bei Muskelarbeit (Fahrradergometer)

Fig.7 zeigt die Ergebnisse eines Arbeitsversuches mit definierter Muskelarbeit, wobei nur relativ geringe Schwankungen des freien Serumcarnitinspiegles auftraten. Der Gesamtcarnitinspiegel und damit der Spiegel der säurelöslichen Acylcarnitine zeigt jedoch deutliche Schwankungen, die in etwa den Ausschlägen des mitbestimmten Enzyms Creatinkinase entsprechen. Bildet man das Verhältnis von Acylcarnitin zu freiem Carnitin, so läßt sich ein deutlicher Anstieg dieses Verhältnisses von o,2o auf fast das Doppelte beobachten. 3o Minuten nach Ende der Belastung ist dieses Verhältnis wieder auf die Ausgangswerte und sogar darunter abgefallen.

2.3. Serumcarnitinspiegel bei gestörter Nierenfunktion

Bei 1o Patienten mit Niereninsuffizienz mit Creatininspiegeln von 1,2 mg/dl bis 9,8 mg/dl zeigte sich, daß sowohl freies Carnitin, als auch vor allem Gesamtcarnitin signifikant über den Werten für die Kontrollgruppe liegen. Es erscheint somit vor allem der Gehalt an säurelöslichen Acylcarnitinen erhöht. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 8b. Eine Korrelation mit dem Creatininspiegel läßt sich nicht zeigen.

2.4. Serumcarnitin bei Fettsüchtigen und im Hunger

Die Carnitingehalte der Seren von sechs übergewichtigen Patientinnen wurden bestimmt. Aus Tabelle 8c geht hervor, daß die Serumkonzentration an freiem

Carnitin und Gesamtcarnitin deutlich über den entsprechenden Normwerten für Frauen liegen, wobei die Erhöhung der Acylcarnitine besonders ins Auge fällt.

Die Patientinnen unterzogen sich einer stationären Reduktionsdiät, wobei zwei der Patientinnen eine Null-Diät, die übrigen vier eine Diät von 5oo Kilo-Kalorien pro die erhielten. Es wurden an verschiedenen Tagen im Verlauf von insgesamt zwei Wochen jeweils Blutproben zur Carnitinbestimmung entnommen. Die Ergebnisse sind in der Fig. 8 dargestellt, aus der sich ersehen läßt, daß, vor allem bei Null-Diät, der Gehalt an freiem Carnitin im Hunger stark abfällt und schließlich nach 6 bis 9 Tagen unter etwa 5o % des Ausgangswertes auf die untere Norm zurückgeht. Dieser Abfall ist weniger stark auch bei zwei der 5oo Kilo-Kalorien pro die-Diäten zu beobachten. Das Gesamtcarnitin fällt im Vergleich zu freiem Carnitin weniger stark ab und nimmt bei den Reduktionsdiäten zum Teil sogar zu. Auffällig ist die zum Teil erhebliche Zunahme der Konzentration von Acylcarnitinen im Serum von 5 der 6 Patientinnen. Ähnliche Ergebnisse haben mittlerweile auch Hoppel und Genuth (53) berichtet.

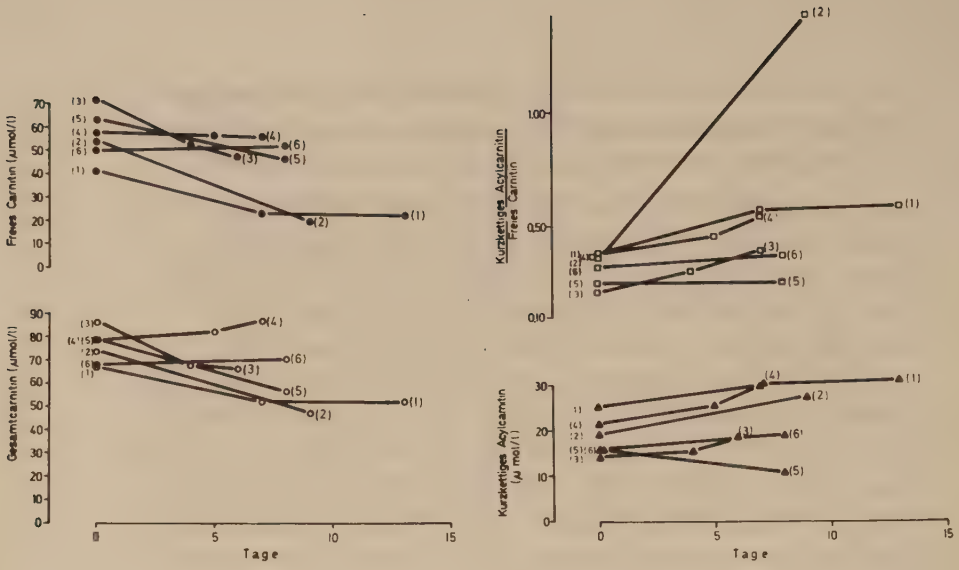

Fig.8: Serumcarnitin von Fettsüchtigen beim Hungern (1, 2: Nulldiät;3, 4, 5, 6: 5ookcal/die, näheres s.2.4.)

2.5. Serumcarnitin bei Diabetes und im Coma Diabeticum

Bei einer insulinpflichtigen, juvenilen Diabetikerin (Typ I), (1o Jahre alt) mit unbeeinträchtigter Nierenfunktion wurde der Serumcarnitingehalt parallel zum Blutzucker über 24 Stunden verfolgt. Die Ergebnisse sind in der Fig.9 dargestellt. Es zeigt sich, daß der freie Carnitinspiegel im Tagesprofil ebenso wie bei der Normalperson relativ konstant bleibt, während Gesamtcarnitin und somit Acylcarnitine in etwa cyclische Schwankungen mit einem Maximum bei etwa 14 Uhr aufwei-

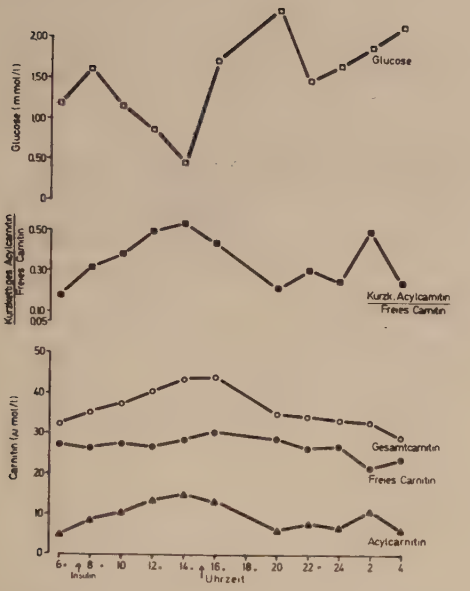

Fig.9: Carnitintagesprofil einer juvenilen Diabetikerin, 10 j.; (* : Mahlzeiten; ↑ : Insulin)

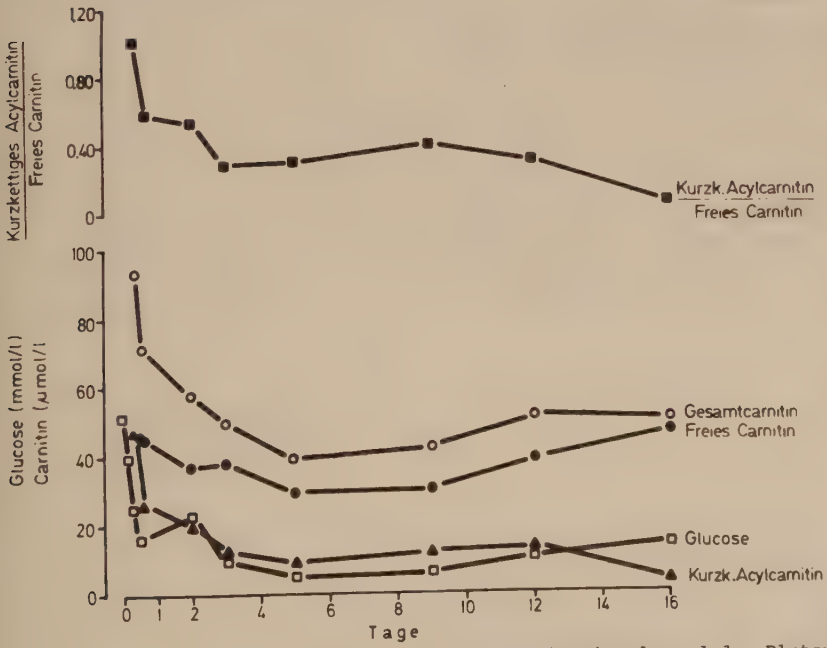

Fig.10: Verlauf des Serumcarnitinspiegels und des Blutzuckergehaltes im diabetischen Coma (Pat. C.H., 63J., w)

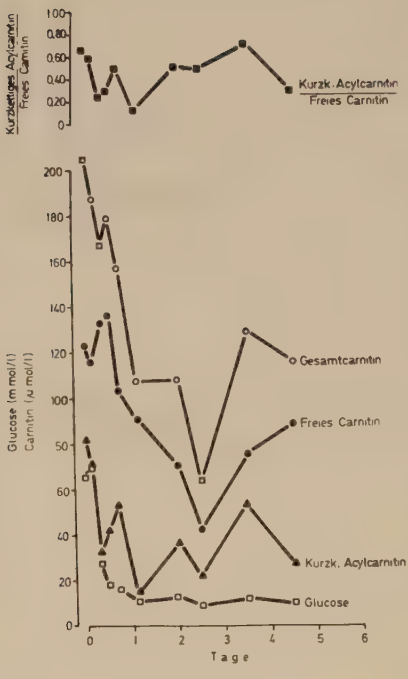

Fig.11: Serumcarnitin und Blutzucker im Coma diabeticum (Pat.W.E., 71 J.w)

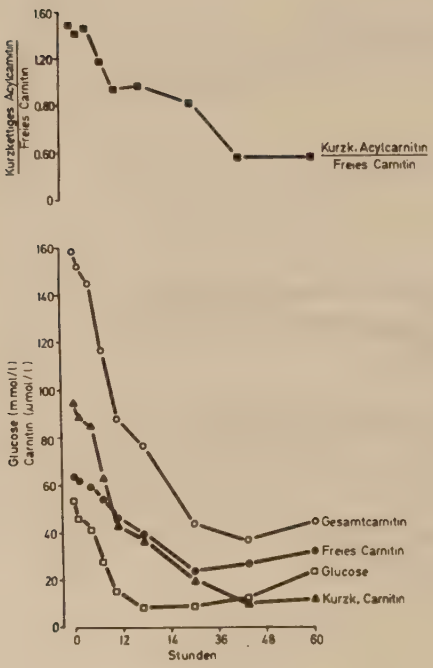

Fig.12: Serumcarnitin und Blutzucker im Coma diabeticum (Pat. K.D., 74 J.,m)

sen. Die Schwankungen des Carnitinspiegels scheinen dabei den Blutzuckerschwankungen eher gegenläufig zu folgen. Insgesamt liegen die Serumcarnitinspiegel der jungen Diabetikerin an der unteren Grenze des Normalbereichs für Frauen.

Drei Patienten , die im Coma Diabeticum zur Behandlung in die Klinik eingeliefert wurden, konnten bezüglich ihrer Blutzucker- und Carnitinspiegel im Therapieverlauf beobachtet werden. Die in den Fig. 1o, 11 und 12 dargestellten Ergebnisse zeigen, daß die anfänglich auf extreme Werte erhöhten Carnitin- und die überproportional noch höheren Acylcarnitinwerte sich im Verlauf der Therapie auf normale Werte senken. Hierbei fällt die Parallelität der Ausschläge zum Blutzucker auf. Carnitinerhöhungen im hier gefundenen Ausmaß traten auch bei schwerer Niereninsuffizienz in unseren Untersuchungen nicht auf, so daß eine Ausscheidungsstörung als alleiniger Grund der beobachteten Anstiege nicht anzunehmen ist. Genuth und Hoppel (48) machten mittlerweile eine ähnliche Beobachtung. Im Unterschied zu unseren Ergebnissen finden die Autoren jedoch anfangs erniedrigte freie Carnitinwerte bei ebenso extrem erhöhten Acylcarnitinspiegeln.

3. Carnitingehalt des Skelettmuskels

In Muskelbiopsien von vierzehn Erwachsenen (sieben Männer und sieben Frauen) im Alter von 18 bis 66 Jahren, bei denen histologisch kein pathologischer Befund vorlag, ergaben sich die in Tabelle 1oa gezeigten Normalwerte.

Tabelle 10: Carnitin im Skelettmuskel

	Freies Carnitin	Gesamtcarnitin	Kurzkettiges Acylcarnitin	Kurzk. Acylc. / Freies Carnit.
a) Kontrollen				
Erwachsene (n=16)	24,3 ± 5,7 (19,5 bis 35,1)	30,1 ± 6,3 (21,0 bis 43.1)	5,8 ± 2,9 (2,8 bis 13,6)	0,25 ± 0,18 (o,13 bis 0,85)
Kinder unter 14 J. (n=13)	17,2 ± 4,0*** (12,1 bis 25,6)	23,3 ± 5,9** (16,1 bis 39,0)	6,1 ± 4,2 n.s. (0,5 bis 13.4)	0,37 ± 0,28 (o,o3 bis 0,93)
b) M.Duchenne (n=5)	11,8 ± 3,8* (6,5 bis 15,8)	16,2 ± 5,0 * (7,4 bis 19,6)	4,4 ± 2,6 n.s. (0,9 bis 8,2)	0,38 ± 0,27 (o,14 bis 0,31)

Zur Entnahme der Proben und Carnitinbestimmung siehe C 1.1. und 2.; zur Zusammensetzumg der Gruppen siehe D 3. sowie E 2.
Angegeben sind $\bar{x} \pm s$ und niedrigster und höchster gemessener Wert in µmolCarnitin/g Non-Collagen-Protein(s. C 4.)
Die Signifikanz von Unterschieden zwischen Kindern und Erwachsenen, sowie zwischen Knaben mit M.Duchenne und Kindern ohne myogene Erkrankung wurde mit dem t-Test für unverbundene Stichproben geprüft;
n.s.: nicht signifikant; * : $p \leq 0{,}01$; ** : $p \leq 0{,}005$; *** : $p \leq =,0005$;

Die Werte für freies Carnitin stimmen gut mit den Ergebnissen von Cederblad et al (23) überein, liegen jedoch zum Teil erheblich über den anderen in der Literatur als "Kontrolle" angegebenen Werten (siehe hierzu Mitchell (72) sowie Tabelle 13). Für Gesamtcarnitin und Acetylcarnitin im Muskel liegen nur spärliche Literaturwerte vor, die jedoch ein ähnliches Verhältnis von Acylcarnitin zu freiem Carnitin zeigen (Di Donato et al (32), (33), Jerusalem et al (57).

Aus dreizehn Muskelbiopsien von Kindern im Alter von 4 Wochen bis 14 Jahren, hiervon 4 Mädchen und 9 Knaben, bei denen sich histologisch entweder kein pathologischer Befund oder jedenfalls keine Lipidspeicherung und kein Morbus Duchenne fanden, ergaben sich die Normalwerte der Tabelle 1o a. Die Ergebnisse für freies Carnitin stimmen gut mit den Befunden von Ikeakor und Lake (55) überein. Für Gesamt- und Acylcarnitin im Muskel von Kindern fand sich keine Literaturangabe.

5 Knaben mit histologisch gesicherter Myodystrophie Morbus Duchenne im Alter von 5 bis 1o Jahren wiesen signifikant niedrigere Carnitingehalte im Muskel als die Normalgruppe auf (siehe Tabelle 1ob). Dies stimmt mit den Ergebnissen von Engel et al (38) überein.

Das Verhältnis von Frischgewicht des Muskels zu Noncollagenprotein beträgt im Mittel etwa 1o : 1, man kann also für freies Carnitin überschlagsmäßig einen Gehalt von etwa 2,4 µMol pro Gramm Frischmuskel

beim gesunden Erwachsenen annehmen. Bei einem Wassergehalt des Muskels von ca. 75 % (1) errechnet sich hieraus für den Muskel eine Carnitinkonzentration von ca. 3 mMol pro Liter. Für Gesamtcarnitin liegt dieser Wert bei etwa 4mMol pro Liter. Ein Vergleich dieser Werte mit Serumgehalten ergibt einen 5o bis 1oo mal höheren Carnitingehalt des Muskels gegenüber dem Serum (siehe E.2).

4. CPT-Aktivität in Skelettmuskel

Sieben Erwachsene im Alter von 23 bis 54 Jahren mit normaler Muskelhistologie und normalen Carnitingehalten wiesen eine CPT-Aktivität, bestimmt nach dem ersten angegebenen Aufschlußverfahren (siehe Methoden, 3.1.), von 4,9 Milli-Einheiten CPT/mg Protein $\pm$ 1,5 (3,5 bis 8,o) auf. Mit dem zweiten angegebenen Aufschlußverfahren (siehe Methoden 3.1., 2. Absatz) wurden die Muskelproben von 1o histologisch erscheinungsfreien Erwachsenen, davon sechs Frauen und vier Männer, im Alter von 29 bis 64 Jahren bestimmt und es fand sich eine mittlere CPT-Aktivität von 5,5 $\pm$ 2,8 Milli-Einheiten/mg Protein (3,4 bis 11,4).

5. Befunde bei metabolischen Myopathien und Carnitin-Mangelsyndromen

Die durch die hier vorgelegte Studie erarbeitete Methode zur Carnitinbestimmung in Serum und Geweben konnte zur biochemischen Untersuchung von Muskelbiopsien eingesetzt werden. Tabelle 11 gibt eine Aufstellung der untersuchten Muskelproben und der gefundenen Carnitingehalte im Muskel. Aus dieser Tabelle ist ersichtlich, daß bei einem großen Teil der morphologisch als Lipidspeichermyopathien klassifizierten Myopathien unter die Norm erniedrigte Carnitingehalte gefunden wurden. Fünf dieser Fälle werden im Folgenden näher erläutert (siehe Tabelle 12). Die Patientinnen C.Z. und P.Sch. sind in der bereits erwähnten Arbeit von Pongratz et al (79) beschrieben worden. Die folgenden Angaben zu Klinik und Morphologie, sowie Teile der biochemischen Befunde sind dieser Arbeit entnommen.

Tabelle 11: Muskelcarnitingehalt bei Patienten mit Myopathien bzw. Kardiomyopathien

Patient	Biopsieort	Histologie	Histochemie	Elektronen-mikroskopie	FC	GC	KAC	CPT	Bemerkungen
a) Lipidspeicher-Myopathien									
C.Z. ;w; 8 W.	nicht angeg.	vacuol. Myop.	Lipid,TypI-F.	Lipid,Mitoch. vermehrt	8,2	11,4	3,2	erhöht	s. D 5.1. und Tab.12
T.H.; m;38 J.	1)m.tib.ant.(li)	dto.	dto.	Mitoch.verm.	15,2	24.4	9,2	obere	s. D 5.3.
(nach 3 M.)	2)m.bic.brac(li)	dto.	dto.	Mitoch.,Lipid, Glycogen verm.	10,2	15,5	5,3	Norm	und tab.12
P.Sch.;w;12J.	m.tib.ant.(li)	dto.	dto.	dto.	5,9	10,1	4,2	niedrig	s. D 5.2. und Tab.12
U.S.; m;43 J.	m.bic.bracch.(li)	dto.	Lipide erh.		3,6	6,0	2,4	n.best.	s. D 5.3. und Tab.12
M.K.; w;11 J.	m.tib.ant.(li)	dto.	dto.		11,9	13,8	1,9	n.best.	
S.A.; w; W.	nicht bek.	dto.	Lipid,TypI-F.		3,2	8,2	5,1	normal	s. D 5.1. und Tab.12
J.R.; w; 8 W.	nicht bek.	Lipidsp.myop.			15,7	24,8	9,1	normal	Serumcarnitin normal
C.D.; m; 9 J.	m.vast.lat.(li)	leichte Myop.	Lipid(gering)		22,6	25,8	3,2	n.best.	
H.D.; m;4o J.	nicht bek.	Rhabdomyol.	Lipid		17,0	21,0	4,0	normal	
b) Kardiomyopathien									
W.S.; m;56 J.	nicht bek.	unauff.	unauff.	Lipide erh.	48,2	53,8	5,6	-	
T.Sch.;w;2 J.	m.gastrocn.	dto.	dto.	Lipide erh.	14,2	16,5	2,3	-	Serumc.norm.
T.W.; m; 4 M.	m.quadr.fem.(li)	Kleinvac. Myopathie	Lipid	Lipid,Mitoch. Glycog.erh.	8,4	10,6	2,2	-	Serumcarn.norm
S.M.; m; 8 W.	m.quadr.fem.	unauff.	unauff.	dto.	9,2	11,9	2,8	-	Serumc. norm.
C.K.; w; 5 M.	dto.	dto.	dto.	-	15,7	25,0	9,3	-	Serumcarn. n.
St.P.;m; 3 M.	dto.	dto.	dto.	Lipde erh.	19,4	35,7	16,3	-	

Tabelle 11: Muskelcarnitingehalt bei Patienten mit Myopathien bzw. Kardiomyopathien

Patient	Biopsieort	Histologie	Histochemie	Elektronen-mikroskopie	FC	GC	KAC	CPT	Bemerkungen
c) Myopathien ohne histologisch sichtbare Lipidspeicherung									
R.P.; w;75 J.	m.quadr.f.(li)	unauff.	keine Speicherg.	Lipide verm.	31,o	38,3	8,3	-	
K.E.; m;19 J.	dto. (re)	dto.	dto.	Mitoch.,Lipid fragl.verm.	18,7	26,6	7,5	-	
H.L.; w;36 J.	nicht bek.	dto.	dto.	Mitoch.,Lipid vermehrt	25,1	35,1	10.0	-	
d) Recidivierende, zum Teil belastungsabhängige Rhabdomyolysen unklarer Genese, keine Glycogenose									
N.M.; m; 3 J.	nicht bek.	Unauff.	unauff.	-	11,2	14,9	3,7	-	
C.A.; m;15 J.	m.quadr.f.(li)	Rhabdomyol.	keine Speich.	-	23,5	26,4	2,9	-	
W.B.; m;18 J.	m.bic.brac.(li)	vac.Myop.	Lipid,TypI-F.	-	22,1	27,8	5,7	hoch norm.	Serumcarn. norm
K.Sch.;w;11J.	nicht bek.	Rhabdomyolyse	keine Speich.	-	13,4	16,5	3,1	niedrig	
E.St.;m;39 J.	m.tib.ant.(re)	Vacuolen,Dystroph.	dto.	-	23,6	28,8	5,2	-	
A.W.; w;23 J.	nicht angeg.	-	-	-	26,6	33,8	7,5	norm.	

Angegeben sind die Gehalte an Freiem Carnitin (FC), Gesamtcarnitin (GC), sowie Kurzkettigem Acylcarnitin (KAC) in µmol/gNCP; Kontrolle siehe Tabelle 10;nähere Angaben zu den Patienten mit Lipdspeichermyopathien und erniedrigtem Muskelcarnitingehalt siehe Tabelle 12 sowie im Text (D 5.)

Tabelle 12: Carnitinmangelsyndrome

		Serum			Erythrocyten				Gewebe			
		FC	GC	KAC	FC	GC	KAC		FC	GC	KAC	CPT
Kind C.Z.		-	-	-	-	-	-	Muskel:	8,0	11,1	3,1	13,0
Kind S.A.		-	-	-	-	-	-	Muskel:	3,2	8,2	5,0	9,4
								Leber:	2,8	3,2	o,4	58,2
								Niere:	3,4	6,6	3,2	16,8
Kind P.Sch.	Dez.78:	34,8	53,5	18,7	33,5	55,0	21,0	Muskel:	5,9	10,1	4,2	3,2
	Nov.79:	11,5	22,6	11,1	8,2	21,1	12,9					
	Feb.8o:	33,2	48,6	15,4								
Pat. T.H.	Dez.78:	34,8	53,5	18,7				Muskel:	15,2	24,4	9,2	(Sep.78)
	Jan.81:	52,4	63,4	11,0					10,2	15,5	5,3	(Dez.78)
Pat. U.S.								Muskel:	3,6	6,o	2,4	-

angegeben sind für Serum und Erythrocyten µmol Carnitin/l; Kontrollen s. Tab.7 und 8a;
Carnitingehalte im Gewebe in µmol/Non-Collagen-Protein (s. C 4.);Kontrollen s. Tab.10; CPT in U/gProtein;Kontrollen s. D 4.; Leber: FC: 5,4; GC: 5,8; KAC: 0,4; Niere: FC: 6,1; GC: 7,7; KAC: 1,6;
FC: Freies Carnitin; GC: Gesamtcarnitin; KAC: Kurzkettiges Acylcarnitin;

5.1. Kind C.Z. und Kind S.A. (systemischer Carnitinmangel, letaler Verlauf)

Das Kind C.Z. fiel klinisch in der dritten Lebenswoche durch Trinkschwierigkeiten sowie ausgeprägte Muskelhypotonie auf und verstarb in der zehnten Lebenswoche noch vor der Diagnosestellung. Aus der Familienanamnese ergibt sich kein Hinweis auf das Vorliegen neuromuskulärer Erkrankungen. Die Eltern des Kindes sowie ein inzwischen 3 Jahre altes männliches Geschwisterkind

erscheinen klinisch gesund. Ein weibliches Geschwisterkind verstarb bereits vorher bei völlig identischem Symptomenbild und Krankheitsverlauf.

Von den im Verlauf des Klinikaufenthaltes durchgeführten Laboruntersuchungen war in beiden Fällen lediglich eine leichte Erhöhung der CK-Aktivität im Serum sowie eine deutliche Vermehrung des Eiweißgehaltes im Liquor auffällig. Verschiebungen des Säurebasenstatus konnten jeweils im Stadium der Ateminsuffizienz registriert werden. Röntgenaufnahmen der Thoraxorgane und das EKG waren unauffällig. Desgleichen ergaben EEG, Echoencephalogramm und Transillumination regelrechte Verhältnisse.
Die progrediente Hypotonie machte parenterale Ernährung erforderlich, das Kind kam schließlich durch zunehmende Ateminsuffizienz ad exitum.
Die Befunde der kurz vor dem Tode durchgeführten Muskelbiopsien konnten schließlich nachträglich zur Klärung des Krankheitsbildes beitragen.
Die histologische Untersuchung ergab die Diagnose einer vakuolären Myopathie mit Verdacht auf pathologische Lipidspeicherung vorwiegend in den Typ I Muskelfasern. Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung wurde ebenfalls eine Verfettung, Glykogenvermehrung sowie Vergrößerung der Mitochondrien gefunden. Näheres siehe Pongratz et al (79).
Wie die Tabelle 12 zeigt, lagen die Gehalte an freiem, sowie an Gesamtcarnitin der Muskelprobe deutlich unter den Kontrollwerten für Kinder.

Der Gehalt an säurelöslichem Acylcarnitin war normal. Auffällig war eine Erhöhung der CPT-Aktivität auf mehr als das Doppelte des Normalwertes. Eine Erhöhung der CPT-Aktivität wurde bereits in der Literatur im Zusammenhang mit einem Carnitinmangel beschrieben (Engel, Angelini (37), Scholte et al (88), Tabelle 13).

Die Verdachtsdiagnose eines "systemischen Carnitinmangels" konnte durch Carnitinbestimmungen im Serum oder in anderen Geweben nicht erhärtet werden, da solches Material nicht vorlag. Die Diagnose stützte sich vornehmlich auf den schweren, rasch zum Tode führenden Krankheitsverlauf sowie die Muskelbefunde.

Der Säugling S.A. fiel bereits am dritten Tag p.n. durch eine ausgeprägte muskuläre Hypotonie auf. Zwei Schwestern des Kindes waren bereits vorher im Alter von ca. 5o Tagen mit ähnlicher Symptomatik verstorben.
Bei Aufnahme im Hauner´schen Kinderspital der Universität München war die Leber 2 cm unterhalb des rechten Rippenbogens tastbar. Das Mädchen entwickelte eine Acidose mit erhöhtem Lactat und Pyruvat im Serum. Die Aldolase im Serum war erhöht. Es bestand eine Aminoacidurie, ferner wurde Protein und Creatin ausgeschieden. Bei sich stetig verschlimmernder Schwäche musste das Kind zuletzt parenteral ernährt werden, verstarb jedoch mit 7 Wochen.

Postmortal entnommenes Gewebe aus Skelettmuskel, Leber und Niere konnte morphologisch und in unserem Labor biochemisch untersucht werden.
Histologisch sowie histochemisch fiel eine starke Lipidspeicherung im Skelettmuskel auf, die vorwiegend die Typ I-Fasern betraf.
Die Ergebnisse der Carnitinbestimmungen sind in der Tabelle 12 zusammengefasst. Im Skelettmuskel ist demnach der Carnitingehalt eindeutig vermindert. Für Leber und Niere lag als Kontrolle nur jeweils eine Autopsieprobe vor. Ein Vergleich mit der Literatur (58), (3o) ergibt jedoch, daß die Carnitingehalte in beiden Organen ebenfalls sicher vermindert sind, der Systemische Carnitinmangel also als gesichert gelten kann. Die Aktivität der CPT war in allen Organen sehr hoch.

5.2. Kind P.Sch.(Muskelcarnitinmangel)

Die Patientin fiel erst vom 9. Lebensjahr an durch zunehmende Ermüdbarkeit mit Schwächen und Erschöpfungszuständen sowie Muskelschmerzen bei körperlicher Belastung auf. Dabei wurde gleichzeitig das Auftreten von Kopfschmerzen, Übelkeit, Tachykardie, Blässe und halonierten Augen beobachtet. Es kam zu keiner weiteren Gewichtszunahme. In Ruhe besserten sich diese Beschwerden rasch.

Das Kind wurde im Alter von 11 Jahren erstmals in der II. Kinderklinik des Krankenhauses München-Schwabing vorgestellt. Es fand sich ein "myopathisches" Elektromyogramm sowie eine erhöhte CK-Aktivität im Serum mit Höchstwerten bis 6oo Einheiten/l. Die zu diesem Zeitpunkt durchgeführte erste Muskelbiopsie gestattete in der Routinehistologie keine diagnostische Einordnung des Krankheitsbildes.
Bei einer neuerlichen klinischen Untersuchung ein Jahr später fiel das inzwischen 12-jährige Mädchen durch seinen Kleinwuchs und sein Untergewicht (27,5 kg bei einer Körperlänge von 138 cm) auf. Neurologisch bestanden damals keine Paresen in Ruhe, bei körperlicher Belastung fiel jedoch eine rasche Ermüdbarkeit sowie ein Nachlassen der Kraft schon nach 3 bis 4 Kniebeugen auf. Bei den durchgeführten Laboruntersuchungen war erneut eine Vermehrung der CK-Aktivität im Serum auf 155 Einheiten/l zusammen mit einer mäßigen Transaminasenerhöhung auffällig. Das Serumlaktat betrug 12,1 mM/l, nach körperlicher Belastung stieg es auf 17,4 mM/l. Die Blutgaswerte zeigten eine leichte metabolische Acidose. Alle übrigen Laborwerte lagen im Normalbereich. Die körperliche Belastung mit einem Fahrradergometer mußte nach 2 Minuten bei einer Leistung von nur 25 Watt wegen völliger Erschöpfung abgebrochen werden. Elektromyographisch fand sich wiederum ein inselförmiges myogenverändertes Innervationsmuster. Die daraufhin veranlaßte zweite Muskelbiopsie konnte dann auch histochemisch, elektronenoptisch und durch unser Labor biochemisch untersucht werden und das Krankheitsbild klären. In der Histologie ergab sich

der Verdacht auf eine pathologische Speicherung, was histochemisch dann als Fettspeicherung vorwiegend in Typ I Muskelfasern beschrieben werden konnte. Elektronenmikroskopisch zeigten sich vermehrte Mitochondrien, in deren Nähe zahlreiche runde, strahlendurchlässige Fettvacuolen auftraten. Außerdem wurden abnorm strukturierte und vergrößerte Mitochondrien beschrieben. Näheres siehe auch hierzu bei Pongratz et al (79).
Die in der Tabelle 12 zusammengestellten Befunde der biochemischen Untersuchung der Muskelbiopsie zeigen eine deutliche Verminderung sowohl des freien als auch des Gesamtcarnitins im Muskel, wobei wiederum, wie im Fall der Patientin C.Z., der Gehalt an säurelöslichen Acylcarnitinen normal ist. Die Carnitinpalmitoyltransferaseaktivität liegt mit 3,2 Einheiten/g Protein gerade noch im unteren Normalbereich.
Die Patientin wurde mit Carnitin p.o. therapiert. Bei ihr konnten mehrfach Serumcarnitinbestimmungen vorgenommen werden. Wie die Tabelle 12 zeigt, war zum Zeitpunkt der Diagnosestellung aufgrund des Muskelcarnitingehaltes der Plasmacarnitingehalt der Patientin im Normbereich für Frauen. Die etwa 1 Jahr später wegen einer akuten Verschlechterung des Zustandes mit cerebraler Symptomatik nach Unterbrechung der Therapie wegen Unverträglichkeitserscheinungen erneut vorgenommene Untersuchung der Blutcarnitingehalte ergab weit unterhalb der Norm liegende Werte für freies Carnitin und Gesamtcarnitin, während der Gehalt an säurelöslichem Acylcarnitin normal war, jedoch gegenüber der ersten Untersuchung deutlich abgefallen war.

Die Kontrolluntersuchung nach Wiederaufnahme der Carnitintherapie ergab bei klinisch unverändert schlechtem Zustand jedoch wieder Serumcarnitinspiegel im Bereich der Norm, die denen der Erstuntersuchung sehr ähnlich waren. Auffällig war bei der Untersuchung der Carnitingehalte in den Erythrocyten der Patientin gleichzeitig mit der ersten und dem zweiten Plasmacarnitinbestimmung, daß nicht nur der Gehalt an freiem Carnitin in den Erythrocyten dem des Plasmas in etwa gleich war, sondern auch der für Gesamtcarnitin und somit für säurelösliche Acylcarnitine. Dies steht im Gegensatz zu der bei gesunden Versuchspersonen in den Erythrocyten beobachteten Erhöhung dieser beiden Konzentrationen gegenüber den Plasmaspiegeln.

5.3. Patient T.H. und Patient U.S. (Muskelcarnitinmangel bei Erwachsenen)

Der 38-jährige Patient T.H. kam wegen Gewichtsverlust und zunehmender Muskelschwäche, die zur Arbeitsunfähigkeit führte, in die Med. Poliklinik der Universität München.
Die klinischen Untersuchungen und Laborbefunde gaben zunächst keinen Hinweis auf die Ursache der Beschwerden. Jedoch deutete ein EMG auf eine myogene Störung hin. Die daraufhin veranlasste erste Muskelbiopsie zeigte morphologisch eine

Lipidspeicherung, vorwiegend der Typ I-Fasern. Der Carnitingehalt dieser Muskelprobe war jedoch, wie der Tabelle 12 zu entnehmen ist, normal. Eine zweite, drei Monate später vorgenommene Biopsie erbrachte morphologisch den gleichen Befund. Diesmal fand sich jedoch bei der biochemischen Untersuchung ein deutlich verminderter Carnitingehalt (siehe Tabelle 12).
Im Serum des Patienten war der Carnitingehalt normal, die Erythrocyten zeigten jedoch, ebenso wie bei der Pat. P.Sch. keine Anreicherung von Acetylcarnitin.
Bei dem Patienten wurde eine Therapie mit Carnitin p.o. und Gabe von mittelkettigen Fettsäuren eingeleitet, die mittlerweile seit drei Jahren andauert und das klinische Bild gebessert, wenn auch nicht behoben hat (Dr. Adam, pers. Mitteilung). Bei Kontrolle erwies sich der Serumcarnitingehalt wieder als normal (siehe Tab. 12).

Der 43-jährige U.S. kam wegen einer hämatologischen Erkrankung in die III.Med. Klinik der Universität München. Er klagte zudem über Myalgien, in deren Gefolge gelegentlich bräunlicher Urin beobachtet wurde, und die besonders nach Kälteexposition oder Fasten auftraten.
Die Muskelbiopsie zeigte lichtmikroskopisch neben Zeichen einer abgelaufenen Rhabdomyolyse eine Lipidspeicherung. Bei der biochemischen Untersuchung fand sich ein ausgeprägter Carnitinmangel (Tab. 12).

Die Aktivität der CPT konnte aus methodischen Gründen damals leider nicht bestimmt werden. Der Serumcarnitingehalt des Patienten war knapp unterhalb der Norm, die Erythrocyten boten keinen auffälligen Befund.

E. DISKUSSION

1. Vorkommen von Carnitin im Körper, Allgemeines zur Funktion

L-(-)Carnitin(β-hydroxy-γ-trimethylaminobuttersäure) und seine Acylderivate konnten in fast allen Geweben des menschlichen und tierischen Körpers nachgewiesen werden. Besonders hohe Gehalte an Carnitin weisen Skelett- und Herzmuskel, Leber, Nieren und Nebenhoden auf. Das Gehirn hat einen auffallend geringen Carnitingehalt (Marquis und Fritz (69); Pearson und Tubbs (78); Mitchell (72)). Fritz konnte zeigen, daß Carnitin essentiell für die Verwertung langkettiger Fettsäuren ist (44), (45), (46). Diese werden extramitochondrial von langkettigem Acyl-CoA auf Carnitin übertragen und können als Acylcarnitinester die Mitochondrienmembran passieren, in den Mitochondrien wieder auf CoA zurückübertragen und der ß-Oxidation zugeführt werden. Diese Übertragungsschritte werden von 2 Carnitinpalmitoyltransferasen (CPT) katalysiert. Ein außen an der mitochondrialen Innenmembran lokalisiertes Enzym CPT_1 katalysiert den ersten Schritt der Übertragung des Acylrestes von Acyl-CoA auf Carnitin, eine an der Innenseite der Innenmembran liegende CPT_2 dagegen die Rückübertragung auf CoA (Yates und Garland (101); Hoppel und Tomec (52); West et al (97)).

Bisher konnte allerdings noch nicht sicher gezeigt werden, ob es sich hierbei um zwei strukturell verschiedene Enzyme handelt, oder ob sich die unterschiedliche Wirkung aus der jeweiligen Lokalisation ergibt.
Mittelkettige Fettsäuren können die Mitochondrienmembran unabhängig vom Carnitinsystem passieren. Man findet jedoch neben der CPT, die spezifisch langkettige Acylreste umsetzt, auch eine für mittelkettige Acylreste spezifische Carnitinoctanoyltransferase (Solberg (92)), sowie ein weiteres, wesentlich aktiveres Enzym, die Carnitinacetyltransferase (CAT), (Fritz et al (47)),

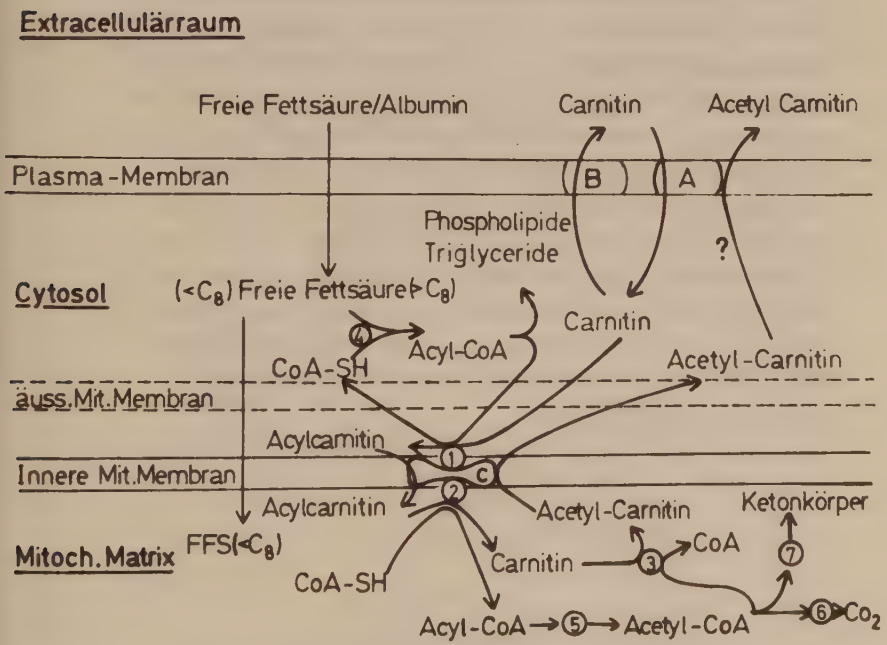

Fig.13: Schema zum Carnitin-abhängigen Fettsäureabbau

(A) : Aktiver Transport
(B) : Carnitin-efflux
(C) : Acylcarnitin-Translocase
(1) : CPT_1; (2) : CPT_2; (3): CAT;
(4):AcylCoA-Synthetase
(5):ß-Oxydation
(6):HMG-CoA-Cyclus
(7):Krebs-Cyclus

das die Übertragung kurzkettiger Acylreste, vorwiegend von Acetylgruppen, katalysiert. Ein Teil des im Körper vorhandenen Carnitins liegt als Acetyl-bzw. kurzkettiges Acylcarnitin vor. Die Bedeutung dieser Carnitinfraktion wird an späterer Stelle noch eingehender diskutiert.

Der Transport der Acylcarnitinester durch die Mitochondrienmembran wird von einem Acylcarnitin-Translocase-Komplex ermöglicht, der von Pande und Parvin (77) für Lebermitochondrien charakterisiert werden konnte (siehe das Schema der Fig. 13). Steht Carnitin nicht in genügender Konzentration zur Verfügung, oder liegt ein Defekt eines der beteiligten Enzyme vor, so kann die Zelle keine ausreichende Energie mehr aus der ß-Oxidation langkettiger Fettsäuren gewinnen. Einziger verbleibender Weg zur Verwertung dieser Fettsäuren ist dann in geringem Umfang ω-Oxidation unter Entstehung von kurzkettigen Dicarbonsäuren (58). Der in besonderem Maße von der Fettsäureverwertung abhängige Muskel ist das dabei bevorzugt betroffene Organ. Ist auch die Leber vom Carnitinmangel mitbetroffen, so ist dort vor allem die Ketogenese schwer beeinträchtigt.

2. Metabolismus von Carnitin: Biosynthese, Verteilung, Aktiver Transport, Carnitingehalte in Muskel, Serum und Erythrocyten, Ausscheidung

Carnitin wird aus Lysin und Methionin im Körper synthetisiert, wie Tanphaichitr und Broquist (93) zeigen konnten. Über eine Reihe von Zwischenstufen, darunter Trimethyllysin, wird γ-Butyrobetain gebildet, das dann schließlich in ß-Stellung unter Bildung von L-Carnitin hydroxyliert wird.

Während die ersten Schritte der Biosynthese in zahlreichen Organen stattfinden können, scheint nach den Ergebnissen von Rebouche und Engel (82) das für den letzten Schritt notwendige Enzym, die γ-Butyrobetain-Hydroxylase beim Menschen nur in Leber und Niere in ausreichender Aktivität vorhanden zu sein. (Siehe Schema der Fig. 14.)

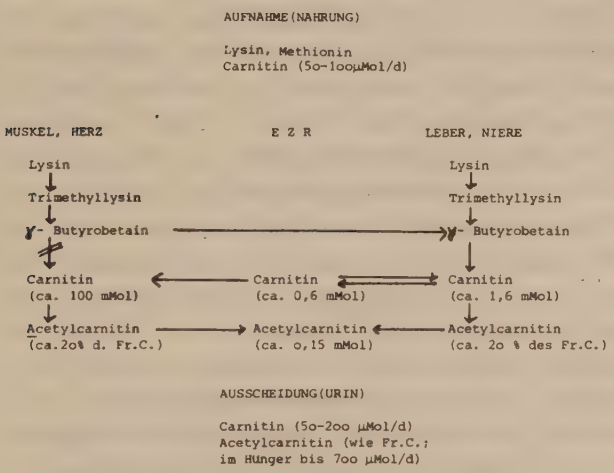

Fig.14: Biosynthese, Resorption, Verteilung und Ausscheidung von Carnitin (Lit. s. Text)

Bisher ist nicht genau bekannt, wie groß der Anteil des im Körper gebildeten Carnitins am gesamten im Körper vorhandenen Carnitinpool ist. Die Ergebnisse von Rudmann et al (83) scheinen jedoch darauf hinzuweisen, daß der größte Teil des vorhanden Carnitins unter normalen Umständen mit der Nahrung aufgenommen wird, und daß die Carnitinbiosynthese erst dann einen nennenswerten Beitrag zum Körpercarnitingehalt leistet, wenn die exogene Zufuhr von Carnitin, bzw. seinen essentiellen Vorläufern Lysin und Methionin nicht mehr ausreicht. Zusammenstellungen über die Carnitingehalte einiger Nahrungsmittel finden sich in der bereits zitierten Arbeit von Rudmann et al (83) sowie bei Mitchell (72). Eigene Untersuchungen (siehe Fig.6) haben ergeben, daß der Carnitingehalt des Serums durch Nahrungsaufnahme nicht eindeutig verändert wird.

Nach der Gabe von ^{14}C-Methyl-markiertem Carnitin an Ratten fanden Lindstedt und Lindstedt (62) eine gleichmäßige Verteilung des Isotops in alle Gewebe mit Ausnahme des Gehirns. Nach 7 bis 1o Tagen fand sich die meiste Aktivität in Muskel und Herz. Nur 2 bis 3 % fanden sich im abgeatmeten CO_2 wieder und nach dem ersten Tag wurden nur etwa o,2 % der Dosis i Urin wieder ausgeschieden. Bei Carboxylmarkierung fand man 3o bis 4o % im Urin und 1o bis 15 % als abgeatmetes CO_2 wieder.

Yue und Fritz (1o2) fanden bei i.V.-Gabe von ^{3}H-markiertem L-Carnitin an Hunde und Ratten 35 % der Aktivität nach 7 Stunden im Urin wieder. Der Rest fand sich fast vollständig in den säurelösli-

chen Anteilen der Gewebe, wobei etwa die Hälfte im Skelettmuskel vorlag. Die Konzentrationen in den Geweben, mit Ausnahme des Gehirns, lagen, je nach Organ verschieden, um das 4- bis 2o-fache über dem Serumspiegel.

Die Anreicherung von Carnitin im Skelettmuskel sowie in anderen Geweben wurde auch für den Menschen mehrfach beschrieben und konnte auch von uns gefunden werden (Cederblad (24); Cederblad et al (23); Cederblad und Lindstedt (21); Pongratz et al (79) und diese Arbeit).
Der Aufgrund dieser Befunde zu vermutende aktive Transport von Carnitin in die Muskelzelle konnte zuerst von Rebouche (80) am isolierten Rattenmuskel nachgewiesen werden. Andere Untersuchungen sowohl am isolierten Muskel als auch an verschiedenen Zellarten in Kultur haben das Vorhandensein des aktiven Transports von Carnitin in die Zellen zwar bestätigt, jedoch eine Reihe sehr unterschiedlicher Daten zur Kinetik und Spezifität dieses Mechanismus erbracht. Böhmer und Mohlstad (1o), sowie (8), (28), (99). Es scheint jedoch sicher zu sein, daß Carnitin und Acetylcarnitin mit gleicher Geschwindigkeit in die Zelle aufgenommen werden, und daß der Transport durch Carnitinkonzentrationen begünstigt wird, die physiologisch im Extracellulärraum anzutreffen sind. Der Austritt von Carnitin aus der Zelle scheint nach Ergebnissen von Mohlstad (73) nach einem anderen Mechanismus vor sich zu gehen, bei dem Carnitin gegenüber Acetylcarnitin begünstigt ist, jedenfalls solange die extracelluläre Carnitinkonzentration sehr klein ist.

Untersuchungen zum Efflux von Carnitin und Acetylcarnitin bei physiologischen Extracellulärkonzentrationen beider Verbindungen sind bisher nicht in der Literatur beschrieben. Interessant an Mohlstads Befunden ist, daß in den von ihm untersuchten Myocyten das sich intracellulär einstellende Acetylcarnitin/Carnitinverhältnis bei extracellulären Carnitinkonzentrationen, die keinen Carnitintransport in die Zelle zulassen dürften, auffällig von dem entsprechenden Verhältnis sowohl im extracellulären Medium als auch in den Zellen in vivo und bei funktionierendem Transport in die Zelle abweicht. Mohlstad findet etwa gleichviel Carnitin wie Acetylcarnitin in der Zelle. Normalerweise macht Acetylcarnitin jedoch nur etwa 2o % des Gesamtcarnitins in Zellen und Serum aus, ausgenommen die Erythrocyten, wo wir ebenfalls ein Verhältnis von etwa 1:1 fanden. Dieser Befund könnte als Hinweis darauf gedeutet werden, daß Acetylcarnitin physiologischerweise, d.h. bei aktivem Transport von Carnitin in die Zelle, gegen dieses im Austausch die Zelle verläßt. Die sich hieraus ergebenden Fragestellungen bezüglich der Rolle von Acetylcarnitin für den Carnitintransport werden später noch erörtert.

Das Muskelgewebe stellt, wie bereits erwähnt, den größten Carnitinpool des Körpers dar. Es scheint, als würde durch die Aufnahme von Carnitin im Muskelgewebe der Carnitinserumspiegel in engen Grenzen reguliert. Muskelgesunde scheinen unseren unseren Untersuchungen nach höhere Carnitingehalte zu haben als Patienten mit Muskelerkrankungen,

auch wenn sie keine Fettspeichermyopathie im Sinne eines Carnitinmangelsyndroms aufweisen. Knaben mit Morbus Duchenne liegen, wie auch Engel et al (38) bereits berichten, signifikant unter den Werten für Kinder mit anderen Störungen, die zur Biopsie Anlaß geben. Die Angabe des Kontrollbereichs für Kinder gestaltet sich dementsprechend schwierig, da Biopsien aus gesundem Muskel nur schwer erhältlich sind. Die von uns untersuchte Gruppe konnte daher nur aus Kindern zusammengesetzt sein, die ausweislich der Muskelmorphologie nicht an einer Fettspeichermyopathie litten, vorwiegend solchen mit einer neurogenen Muskelschädigung. Die signifikante Erniedrigung der Kontrollwerte gegenüber Erwachsenen, wie sie an einem ähnlich zusammengesetzten Krankengut, auch Ikeakor und Lake (55) finden, ließe sich jedoch auch gut mit den Befunden von Rebouche und Engel (81) in Einklang bringen, wonach das Enzym γ-Butyrobetainhydroxylase, das den letzten Schritt der Carnitinbiosynthese in Leber und Niere katalysiert, ebenfalls in seiner Aktivität erst bei einem Alter von etwa 15 Jahren den Erwachsenenwert erreicht. Unter Umständen, so überlegen die Autoren, spiegelt sich hierin nur ein entsprechend der geringeren Muskelmasse erniedrigter Carnitinbedarf.

Der Carnitinserum- bzw.-plasmaspiegel des stoffwechselgesunden Menschen ist intraindividuell sowohl im circadianen Verlauf als auch über längere Zeiträume hinweg recht stabil. Kurzfristige Änderungen spielen sich vorwiegend in der Verteilung

der einzelnen Carnitinfraktionen ab. Eine Altersabhängigkeit des Serumspiegels wurde bisher nicht untersucht. Schmidt-Sommerfeld (85) findet für Neugeborene Serumcarnitinwerte, die unter denen der von ihm untersuchten Erwachsenen liegen. Hormonelle Einflüsse auf den Carnitinspiegel, die die von uns gefundenen Unterschiede des freien Carnitins im Serum bei Männern und Frauen erklären könnten, werden an anderer Stelle erörtert. Erniedrigte Serumcarnitinspiegel wurden, außer beim systemischen Carnitinmangel, bisher vor allem bei Patienten unter Hämodialyse, sowie vereinzelt bei solchen mit Morbus Crohn und einigen Malabsorptionssyndromen und Anorexia Nervosa gefunden (Bohmer et al (6); König et al (6o)). Außerdem wurden erniedrigte Carnitinserumspiegel bei Schwangeren beschrieben (4), (86), hierzu siehe 4.). Die von Rudman et al (83) untersuchten kachektischen Patienten mit Lebererkrankungen wiesen erniedrigte Serum- und Gewebscarnitinspiegel auf. Hierbei dürften wohl Mangeldiät und Biosynthesestörung zusammen eine Rolle spielen.

Erhöhungen des Serumcanitinspiegels fanden wir bei Patienten mit dekompensierter Niereninsuffizienz. Dieses Ergebnis bestätigt frühere Befunde von Bohmer et al (6) sowie von Chen und Lincoln (26). Unseren Ergebnissen nach ist bei diesen Patienten besonders der Acylcarnitinanteil im Serum erhöht. Eine Korrelation zur Erhöhung des Serumcreatinins besteht nicht. Eine weitere Ursache erhöhter Serumcarnitinspiegel ist die

Zerstörung größerer Muskelmassen, etwa nach Operationen, oder auch nach Rhabdomyolysen bei Morbus Duchenne (siehe Di Mauro et al (35) sowie Maebashi et al (66)). Die Muskelnekrose im Rahmen eines Herzinfarkts führt nach der bereits zitierten Untersuchung von Chen und Lincoln nicht zu einer signifikanten Carnitinerhöhung im Serum. Den hier vorgelegten Untersuchungen zufolge sind die Serumcarnitinspiegel bei Fettsucht erhöht, außerdem führt eine diabetische Ketoacidose zu massiven Erhöhungen von Carnitin und Acylcarnitin im Serum. Ähnliche Veränderungen wurden von Genuth und Hoppel (48) mittlerweile beschrieben. Diese Veränderungen sowie die Änderungen im Carnitinstoffwechsel beim Hungern werden später noch näher diskutiert.

Wie die vorliegende Arbeit erstmals zeigt, läßt sich Carnitin auch in den Erythrocyten nachweisen, und zwar in Konzentrationen, die für freies Carnitin dem Serumspiegel entsprechen. Das kurzkettige Acylcarnitin ist in den Erythrocyten dem Serum gegenüber sogar angereichert und es ergibt sich ein gegenüber dem Serum erhöhter Gesamtcarnitinspiegel. Erklärbar wäre dies durch das Vorhandensein einer Carnitinacetyltransferaseaktivität, wodurch Acetylcarnitin zwar gebildet wird, wegen des Fehlens eines aktiven Transports von Carnitin in den Erythrocyten jedoch nicht im Austausch gegen dieses die Zellen verläßt. Eine CPT-Aktivität von Erythrocyten konnte bereits 1976 von Wittels und Hochstein

(1oo) nachgewiesen und neuerdings von Scholte et al (87) bestätigt werden, wobei die letztere Untersuchung aufgrund kinetischer Untersuchungen zu dem Ergebnis kommt, daß nur die (extramitochondriale) CPT_1 vorhanden ist. In zwei Fällen von Muskelcarnitinmangel fanden wir, daß die beim Gesunden beobachtete Anreicherung von Acetylcarnitin gegenüber dem Serum nicht mehr stattfindet. Es bleibt noch zu untersuchen, inwieweit dies in einem Zusammenhang mit der Erkrankung steht.

Die Ausscheidung von Carnitin geschieht vorwiegend über die Niere. Dabei wird Carnitin zum grössten Teil unverändert ausgeschieden, und zwar sowohl als freies als auch als Acylcarnitin (siehe Schema der Fig. 14). Es wurden jedoch auch Abbauprodukte wie β-Methylcholin und andere gefunden (Khairallah und Wolf (59); Mehlman et al (71); Seim und Strack (89)). Die Höhe der Carnitinausscheidung im Urin schwankt interindividuell ganz erheblich, sie ist tagsüber höher als nachts und bei Frauen niedriger als bei Männern. Ferner ist sie vom Ernährungszustand abhängig. Bei Knaben mit Morbus Duchenne ist die Carnitinausscheidung im Urin signifikant erniedrigt (siehe hierzu Cederblad und Lindstedt (21); Maebashi et al (66)).

3. Rolle der Acylcarnitine in Gewebe und Plasma

Carnitin liegt im Körper als freies Carnitin sowie in Form seiner kurz- und langkettigen Fettsäurederivate vor, wobei das freie Carnitin den größten Teil ausmacht. Der Anteil der Acylcarnitine am Gesamtcarnitin ist für die einzelnen Organe verschieden. Bei der Ratte fanden Pearson und Tubbs (78) einen Anteil der kurzkettigen Acylcarnitine in Leber und Niere, sowie im Skelettmuskel von etwa 2o bis 3o % des Gehalts an freiem Carnitin. Im menschlichen Skelettmuskel machen die kurzkettigen Acylderivate den hier vorgelegten Ergebnissen nach ebenfalls ca. 2o bis 3o % des Gehaltes an freiem Carnitins aus. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen auch Di Donato et al (32), (33).

Über die Gewebekonzentrationen der langkettigen Acylcarnitine liegen für den Menschen nur vereinzelt Literaturangaben vor (Di Donato et al (31), (33), Chapoy et al (25)), denen zufolge sie ca. 1 - 3 % des Gehalts an freiem Carnitin ausmachen!

Spiegel der Acylcarnitinderivate im Serum bzw. Plasma werden erst in der neueren Literatur vereinzelt angegeben. Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse, sowie Arbeiten von Genuth und Hoppel (48), (49), (53) zeigen in etwa übereinstimmend, daß die kurzkettigen, säurelöslichen Acylcarnitine im Serum etwa eine Konzentration von 2o bis 3o % des freien Carnitins erreichen. Der Anteil der lang-

kettigen Acylcarnitine beim Gesunden scheint nach den oben zitierten Arbeiten von Genuth und Hoppel unter 1o % zu liegen.
Choi et al (27) haben bei der Ratte die kurzkettigen Acylcarnitine bezüglich ihres Acylrestes untersucht. Sie fanden,daß in allen untersuchten Organen der größte Anteil von Acetylcarnitin gestellt wird, zum Beispiel ca. 9o % in Skelettmuskel. Der Rest entfiel auf andere kurzkettige Fettsäureester, wie Propionyl- und Butyrylcarnitin. Bei derartigen Untersuchungen in menschlichem Gewebe fanden Di Donato et al (32), (33), daß Acetylcarnitin etwa 5o % der kurzkettigen Acylcarnitine ausmacht. Ferner ergeben sich aus den Untersuchungen gute Hinweise darauf, daß das Muster der kurzkettigen Acylcarnitine im Serum dem in der Leber entspricht.

Während die langkettigen Acylcarnitine als reguläre Intermediate des Carnitin-abhängigen Fettsäuretransports in die Mitochondrien aufzufassen sind, gibt es für das Vorkommen der kurzkettigen Acylcarnitine sowohl in den Zellen als auch im Serum bisher keine völlig befriedigende Erklärung.
In der hier vorliegenden Arbeit, wie auch in den Arbeiten von Genuth und Hoppel (48), (49), (53) wurden auffällige Änderungen des Acetylcarnitin-Carnitin-Verhältnisses in bestimmten Stoffwechsellagen, vor allem im Hunger und in der diabetischen Ketoacidose beobachtet, die zu der Annahme geführt haben, daß ein erhöhter Anfall von Acetyl-CoA sich in einem Ansteigen des Acetylcarnitins wiederspiegelt. Auch die Ergebnisse der bereits zitierten Arbeit von Di Donato et al sprechen für einen

solchen Mechanismus. Auf diese Befunde wird an späterer Stelle noch gesondert eingegangen.

Wie bereits angedeutet, wäre auch die Rolle von Acetylcarnitin für den Carnitintransport in und aus der Zelle zu diskutieren. Die bereits zitierte Arbeit von Mohlstad (73) an der isolierten Herzmuskelzelle gibt deutliche Hinweise, daß Acetylcarnitin wesentlich langsamer als Carnitin die Zelle verläßt, wenn kein Carnitintransport in die Zelle stattfindet. Eine Verschiebung des intracellulären Acetylcarnitin/Carnitin-Verhältnisses zu Gunsten eines erhöhten Acetylcarnitinanteils könnte so den Carnitinaustritt aus der Zelle verringern, während umgekehrt ein verringerter Anfall von Acetylcarnitin einen größeren Carnitinefflux zur Folge hätte. Außerdem könnte Acetylcarnitin, das intracellulär rasch aus Carnitin entsteht (73), im Austausch für Carnitin, das in die Zelle transportiert wird, diese verlassen. Pande und Parvin (77) haben gezeigt, daß die Aktivität des Acylcarnitin-Translokase-Komplexes von Acylcarnitin mit zunehmender Kettenlänge des Acylrestes verstärkt aktiviert wird. Ferner findet beim Transport von Acylcarnitin in die Mitochondrien ein Austausch gegen Carnitin oder Acetylcarnitin aus den Mitochondrien statt. Während langkettige Acylcarnitine intramitochondrial sofort weiter in den Stoffwechsel eingeführt werden können, ist der Beitrag des aus AcetylCoA entstehenden Acetylcarnitins für den Austausch gegen Acylcarnitin sicher nicht zu vernachlässigen und eine aktivierende Rolle eines erhöhten Acetylcarnitin/Carnitin-Verhältnisses in den Mitochondrien auf den Acylcarnitintransport wäre vorstellbar.

4. Geschlechtsunterschiede im Carnitinstoffwechsel, hormonelle Einflüsse

Der bereits von Cederblad (24) im Unterschied zu anderen Autoren erhobene Befund, wonach Frauen signifikant niedrigere Serumcarnitinspiegel als Männer haben, konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Darüber hinaus zeigte sich, daß diese Erniedrigungen nur den Anteil des freien Carnitins im Serum betrifft. Der Spiegel der kurzkettigen Acylcarnitine ist bei Männern und Frauen gleich. Im Muskel ließen sich derartige Unterschiede des Carnitingehalts zwischen Männern und Frauen nicht zeigen. Bereits in einer früheren Arbeit hatten Cederblad und Lindstedt (21) Unterschiede in der Carnitinausscheidung im Urin zwischen Männern und Frauen festgestellt, wobei Frauen eine deutlich geringere Carnitinausscheidung aufwiesen. Versuche, diese Unterschiede mit der Gesamtkörperzellmasse oder mit unterschiedlicher Muskelbelastung zu korrelieren, schlugen fehl. Maebashi et al (67) fanden ebenfalls unterschiedliche Carnitinurinausscheidung bei Männern und Frauen und außerdem bei Frauen einen Anstieg der Serumcarnitinspiegel zum Zeitpunkt der Ovulation, der von einem entsprechenden Anstieg der Urinausscheidung von Carnitin begleitet war. Nach der Ovulation fallen Serumcarnitinspiegel und Ausscheidung wieder ab. Scholte et al (86) fanden bei Frauen im Verlauf der Schwangerschaft einen starken Abfall des Serumcarnitinspiegels um bis zu 5o % zum Zeitpunkt der Geburt. Ähnliche Ergebnisse beschrieben Angelini et al (4).

Die sich daraus ergebenden Hinweise auf hormonelle Einflüsse auf den Carnitinhaushalt werden durch Tierexperimente von Borum (11) an kastrierten Ratten gestützt. Die Autorin konnte zeigen, daß der Serumcarnitinspiegel männlicher Ratten bei Kastration oder Östrogengabe auf die Werte für weibliche Ratten abfällt. Umgekehrt steigen die sonst signifikant erniedrigten Serumcarnitinspiegel geschlechtsreifer weiblicher Ratten nach Androgengabe auf die Werte für männliche Ratten an. Bei der Geburt liegen die Serumspiegel der weiblichen Ratten ebenso hoch wie die für männliche. Der Mechanismus dieser hormonellen Regulation des Carnitinserumspiegels ist nicht bekannt. Nach Brooks et al (16), Marquis und Fritz (70), Böhmer und Hansson (7),(9), zitiert nach Brooks (43), ist jedoch der aktive Transport von Carnitin in den Nebenhoden Testosteron-abhängig. Kastrierte Tiere reichern im Nebenhoden kein Carnitin an, wenn ihnen nicht Testosteron verabreicht wird. Eine Beeinflussung des aktiven Transports in anderen Körperzellen nach diesem Muster wäre denkbar und die regulatorische Funktion von Testosteron dadurch zu erklären. Nach den bereits zitierten Arbeiten von Marquis und Fritz (7o) sowie nach Brooks (17) und (18) ist auch die Aktivität der Enzyme Carnitinacetyltransferase und Carnitinpalmitoyltransferase, zumindest im Nebenhoden, Androgen-reguliert. Im Androgen-verarmten Nebenhoden nimmt die Aktivität beider Enzyme ab und die Gewebe verbrennen eher Kohlenhydrate als Fette.

5. Carnitinstoffwechsel in der Ketose

Die Bedeutung von Carnitin für den Fettstoffwechsel legt die Suche nach Veränderungen des Carnitinhaushalts in Zuständen nahe, bei denen der Fettsäurestoffwechsel verändert ist. Untersuchungen an Tieren (Pearson und Tubbs (78); Brass und Hoppel (14), (15)) und beim Menschen (Genuth und Hoppel (48), (49), (53)) haben auffällige und charakteristische Veränderungen des Carnitinsystems im Hunger und im Diabetes gezeigt. Diese äußern sich zum einen in Änderungen der absoluten Carnitinkonzentrationen in verschiedenen Organen und im Serum, zum anderen jedoch auch in einer veränderten Verteilung der Carnitinfraktionen, d.h. freiem Carnitin, kurz- und langkettigen Acylcarnitinen.

Im Tierversuch wurde eine Zunahme an Lebergesamtcarnitin bei hungernden und diabetischen Tieren beschrieben, wobei die Änderungen der Lebercarnitine, insbesondere des Acetylcarnitins der Ketogenese in der Leber parallel zu laufen scheinen.
Die bereits zitierten Arbeiten von Brass und Hoppel (14), (15) an der Ratte lassen den Schluß zu, daß die typischen Veränderungen des Acetylcarnitin/Carnitin-Verhältnisses im Hunger im Sinne einer deutlichen Zunahme von Avetylcarnitin wohl eine vermehrte Verfügbarkeit von Acetyl-CoA wiederspiegeln und somit Folge einer gesteigerten Lipolyse sind. Eine regulatorische Funktion des Acetylcarnitin/Carnitin-Quotienten auf die Ketogenese ist den Autoren zufolge demgegenüber eher unwahrscheinlich.

Die in der hier vorgelegten Arbeit untersuchten Patienten unter Reduktionsdiät zeigen, dem Tierversuch entsprechend, einen Abfall des freien Carnitins und einen Anstieg der kurzkettigen Acylcarnitine. Ähnliche Befunde finden sich in der bereits zitierten Arbeit von Hoppel und Genuth (53). Im ketoacidotischen Coma fanden wir einen excessiven Anstieg des Gesamtcarnitins, wobei die kurzkettigen Acylcarnitine überproportional beteiligt waren. Dies dürfte einen Acetylgruppenüberschuß wiederspiegeln, der in der Leber aufgrund der gesteigerten Lipolyse besteht. Unter Insulintherapie normalisierten sich diese Befunde parallel zur Senkung des Blutzuckerspiegels rasch. Gut eingestellte Diabetiker weisen in ihrem Serumcarnitinspiegel offenbar keine signifikanten Änderungen zu den Kontrollen auf, wie Böhmer et al (6) fanden. Hoppel und Genuth (siehe oben) findenbei neuentdeckten Diabetikern mit Ketonkörpererhöhungen im Plasma, jedoch ohne Acidose, Veränderungen im gleichen Sinne, die bei der Ketoacidose dann verstärkt ausgeprägt sind und sich unter Insulintherapie bessern. Sie beschreiben eine Korrelation zwischen dem Abfall des Acetylcarnitin/Carnitin-Verhältnisses und dem ß-HOB-Abfall, obwohl die Ausgangswerte nicht korrelieren. Di Donato et al (33) beschreiben bei Patienten mit Muskelcarnitinmangel im Hunger, wie bei den gesunden Probanden, einen Anstieg der Acylcarnitine zusammen mit den Ketonkörpern im Serum, der freilich ihrer Deutung nach infolge der erhöhten Verfügbarkeit im Muskel nicht verbrauchter freier Fettsäuren für die Leber ausgeprägter als bei den Kontrollen ist.

Eine zweite Patientin mit Carnitinmangel auch in der Leber zeigte, trotz Anstieg der freien Fettsäuren im Serum, im Hunger nur einen geringen Anstieg der Ketonkörper, und zwar in Serum und Leber. Der erniedrigte Lebercarnitingehalt scheint also, so der Schluß der Autoren, eine ausreichende Ketogenese nicht zu ermöglichen. Der Anstieg der Plasmacylcarnitine war dementsprechend gering, ein weiterer Hinweis, daß das Verhältnis von Acylcarnitin zu freiem Carnitin im Serum den Acylierungsgrad in der Leber und damit den Umfang der Ketonkörperbildung wiederspiegelt.

Genuth und Hoppel weisen in der zitierten Arbeit jedoch darauf hin, daß ihren Ergebnissen zufolge Abfall von freiem Carnitin und Anstieg von Acetylcarnitin nicht streng proportional verlaufen, daß bei diesen Bewegungen also wohl auch noch andere Faktoren, wie etwa die Verfügbarkeit von Carnitin, eine Rolle spielen. Selbstverständlich müßten Änderungen der Carnitinaufnahme und-abgabe der Zellen mitberücksichtigt werden, da sich hier Unterschiede in Abhängigkeit vom Acylierungsgrad ergeben könnten.

6. Carnitinmangel: Übersicht zu Klinik, Pathogenese, Diagnostik, Differentialdiagnose und Therapie

Nach dem derzeitigen Wissen um die Rolle von Carnitin im Fettsäurestoffwechsel sind folgende Störungen dieses Systems denkbar: Ein absoluter Mangel an Carnitin in der Zelle hätte eine Hemmung der Fettsäureverwertung zur Folge, die gleiche Wirkung müßte ein Defekt einer der beiden Carnitinpalmitoyltransferasen haben. Welche Auswirkungen ein Ausfall der anderen beiden Carnitinacyltransferasen oder des Acyl-Carnitin-Translocasekomplexes haben könnte, wurde bisher nicht untersucht. Die anderen postulierten Störungen wurden jedoch in einer Reihe von Fällen, in jüngster Zeit mit zunehmender Häufigkeit, beschrieben (siehe Tabelle 13 und Figur 13).

Engel hat 1973 (36), (37) erstmals eine Patientin mit zunehmender Muskelschwäche beschrieben, deren Skelettmuskel in der Biopsie Fetteinlagerungen, bevorzugt in den Typ I-Fasern, zeigte und der Palmitat wesentlich langsamer als Kontrollgewebe gesunder Probanden oxydierte. Carnitinzusatz normalisierte die Oxydationsrate. Der Muskel der Patientin wies einen gegenüber der Kontrolle deutlich verminderten Carnitingehalt auf. Die Aktivität der CPT war um ca. 5o % erhöht, ebenso die AcylCoA-Synthetaseaktivität. Der Serumcarnitinspiegel der Patientin war nicht erniedrigt.

Karpati et al (58) beschrieben 1975 ein Krankheitsbild, bei dem neben der Muskelschwäche noch eine Reihe schwerer Allgemeinsymptome und Funktionsstörungen der Leber sowie eine Enzephalopathie zu beobachten waren. Die Muskelbiopsie entsprach in ihrem Befund der von Engel beschriebenen. Darüberhinaus war jedoch auch die Leberbiopsie verändert und wies einen erniedrigten Carnitingehalt auf. Außerdem war der Plasmacarnitinspiegel erniedrigt. Orale Gabe von Carnitin besserte das klinische Bild drastisch, obwohl die Muskelbefunde sich kaum veränderten. Die Autoren bezeichneten die Erkrankung als "Systemischen Carnitinmangel" und grenzten sie so von dem von Engel beschriebenen Bild des "Muskelcarnitinmangels" ab. Derartige Krankheitsbilder sind seitdem häufiger berichtet worden. Auch in der vorliegenden Arbeit können einige Beispiel beschrieben werden.

Klinisch anders manifestiert sich der Defekt der Carnitinpalmitoyltransferase, welcher von Di Mauro und Melis-Di Mauro (34) zuerst gefunden wurde. Die Patienten fallen durch belastungsabhängige Rhabdomyolysen mit Myoglobinurie auf, die besonders nach Hungerperioden oder Kälteexposition auftreten. Muskelbiopsien dieser Patienten weisen nur selten Verfettungen auf, ihr Carnitingehalt ist normal. Die Aktivität der CPT ist dagegen deutlich verringert, bei einigen Patienten konnte gleichzeitig eine, wohl

kompensatorische Erhöhung der COT- und CAT-, sowie der AcylCoA-Synthetase-Aktivität nachgewiesen werden (5). Es konnte in einem Fall bisher auch ein isolierter Defekt der intramitochondrialen CPT_2 bei fast unveränderter Gesamt-CPT-Aktivität nachgewiesen werden (Scholte et al (87)). Diesem Befund zufolge läßt sich ein CPT-Mangel erst durch eine getrennte Bestimmung von CPT_1 und CPT_2 an intakten Mitochondrien sicher ausschließen.

CPT-Aktivitäten werden außer im Muskel auch in anderen Organen sowie in Leukocyten und Erythrocyten beschrieben. Auch dort sind beim CPT-Mangel die Aktivitäten vermindert, ein Krankheitsbild des CPT-Mangels läßt sich also durch Untersuchung der Leukocyten oder auch beispielsweise von kultivierten Hautfibroblasten nachweisen (siehe oben zitierte Arbeit von Scholte et al).

Eine Übersicht über die Literatur zu den Carnitinmangelsyndromen (siehe Tabelle 13) zeigt, daß all diesen Erkrankungen ein morphologisches Substrat, nämlich die Lipidspeicherung vorwiegend der Typ I Muskelfasern, und biochemisch ein erniedrigter Carnitingehalt des Muskels oder auch anderer Gewebe gemeinsam sind. Ansonsten findet man jedoch

Tabelle 13: Übersicht über bisher beschriebene Carnitinmangelsyndrome

a) Klinische Daten

Literatur	Patient	Klinisches Bild					Beginn	Familie
		Hypotonie	Hepatopathie	Encephalop.	Gewichtsverl.	sonstiges		
(36),(37)	24 J. w	+	-	-			LJ	-
(68)	61 J. w	+	-	-			38.LJ	
(53)	11 J. m	+	+	+	+	"Reye-Sy." nach Infekt Hypoglycämien	4.LJ	-
(95)	8 J. m	+	(+)	-		Lactaterh. bei Belastg.	2.LJ	-
(91),(54)	11 J. m	+	?	(+)	+			-
(2),(3)	10 J. w	+	-	-	-		7.LJ	-
(56)	2o J. m	+	-	-	+	im Hunger norm.Ketonk. bildg.	18.LJ	-
(84)	36 J. m	+	-	-		ß-HOB,FFsrn. im Serum erh.	34.LJ	-
(3o)	28 J. w	+	?	+	?	Hypoglycämie; Mit 26 J. akute Verschlechterg. im 7.Schw.sch.monat nach 2 J. verstorben	16.LJ	-
	J. m	+	+	+		Hypoglycämien; Tod im Coma	4.LJ	-
	19 J. w	+	?	+		Verstorben	16.LJ	-
(33)	5 J. m	+	+	?		episodisch Acidose	frühe Kindh.	-
(51)	2 J. m	+	+	-	+	Kardiomyop.; verstorben	2. LJ	-
(4)	16 J. w	+	?	-	-	nach 1. Schwangersch.; dann spontane Besserung	16.LJ	-

Tabelle 13:

b) Morphologie, Biochemie, Therapie, Anmerkungen

Lit.	unters. Organ	Morphologie	Biochemie:Patient Fr.Carn.	Ges.Carn.	angeg. Kontrollen Fr.Carn.	Ges.c.	(n) Dim:	Bemerkungen; Therapie
(36)	Muskel	Vacuol.Myopathie, Lipidspeicherg. vorwiegend in Typ 1 - Fasern	1,14 bis 4,44*		13,92 ± 0,29		(18)	Carnitin p.o.u.Cor t. führen zu Besserg. CPT erh.
(68)	Muskel	dto.	1,9		13,92±0,92 (s.o.)		(18)	Lipid auch in Leukoc. und Nerven
	Serum	-	49	-	23 - 70(s.( ))			
(58)	Muskel	Lipidspeicherg in Typ1-Fasern;	0,5	-	wie oben			erfolgr. Carnitin p.o
	Leber	unauff.	0,73	-	6,8±0,7	-	(1o)	
	Plasma	-	7,9	-	51,6±2,48;	-	(?)	
(95)	Muskel	Lipidsp. Typ1-Fasern	0,24	-	2,6±0,61;	-	(11) *	Cortisontherapie
	Serum	-	32	-	46 ± 13;	-	(23)	
(91)	Muskel	Lipidsp. vorw. Typ1-Fasern;	2,61	-	11,6;13,4; 15,7	-	#	Carnitinp.o. über 2 J.erfolgr.
	Plasma	-						
(54)	Muskel	Lipidsp.,vorw. Typ1-Fasern;	o,81	-	15,6±1,45	-	(6)	Carnitin p.o. erfolgr über 5 J.; Muskelcarn. steigt auf 1,81 an;
	Serum	-	32	-	23 bis 55	-	(1o)	
(56)	Muskel	Lipidsp.,Typ1-F.;Mitoch.veränd.	0,18;0,29	-	3,7±0,40	-	(6) *	Verm.Ca-aufnahme d.Sarkolemms; Cortis.,Propranolol;
	Serum		46,6	-	54,9±2,3	-	(5)	
(34)	Muskel	Lipidsp.,vorw. Typ1-Fasern	2,75	-	9 bis 18	-	(5)	erolgr.Carnitinth. Verschl.auf Cortis.
(3o)	Muskel	dto.	4,0	-	16,0±2,6	-	(?)	CPT normal Tod vor Diagnosest.!
	Muskel	dto.	3,9	-	s.o.	-		Carnitin ohne Wirkg.!
	Serum		24,7	-	57,9±12,0	-	(?)	Herz, Leber u.Niere postmort. verfettet;
	Muskel	dto.	1,5	-	s.o.	-		
	Serum		14,8	-	s.o.	-		Herz,Leber Niere verfettet;
(38)	Muskel	dto.;Mitoch. verändert;	0,94	-	14,6±0,93	-	(21)	Tod vor Diagnosest.!
(51)	Muskel	dto.	0,86	-	1,59±?	-	(6) *	Carnitin erfolglos!
	Herz	Vacuolen;Kein Lipid;Mitoch.veränd.	0,3o2	-	0,513±?	-	(7) *	
(4)	Muskel	Lipidspeicherg.	1,53		10 bis 23	?	(?)	kurzk.Acylcarn.nicht
	Serum		19,8	23,6	41,8±5,45;	n.ang.	(9)	messbar;Carnitinth.

Tabelle 13 (Forts.)

Literatur	Patient	Klinisches Bild				Beginn	Familie
		Hypotonie	Hepatopathie	Encephalop.	Gewichtsverl.	Sonstiges	
(31)	2 J. w	+	+	-		Lactat u. Pyruvat im Serum erh.	-
(38)	15 J. w	+	?	+	+	episodische Acidosen; akute Verschl. nach Infekt; verstorben	v. Geburt, Eltern und Geschwister: erh. CPT!
	7 J. w (Schwester)	(+)	-	-	-	"gesund"	- s.o.
(4o)	13 W. m	+	?	?	+	verstorben	-
(79)	8 W. w	+	+	+	+	verstorben	3. Woche Schwester mi gleichen Ers
(s.C 5.)	12 J. w	+	-	(+)	+	path. Lactat- anstieg bei Bel.; mit 13J. akute Verschlechterg.	9.LJ verstorben -
(33)	36 J. w	+	?	-	-	nach 3. Schw.sch.! beim Fasten keine Ketonk.-bildg.!	36.LJ -
	38 J. m	+	-	-	-	beim Fasten erhöhte Ketonkörper!	-
(57)	47 J. m	+	+	-	-	bei Beslastg. Myalgien	20.LJ -
(9o)	4 J. m	+	-	-	+		-
(25)	3 J. m	+	+	?	-	Kardiomyop.! "Reye-Syndr." nach Infekt; Hypoglycämien; Acidose	3. Monat -
(94)	9 J. w	-	-	-	-	Kardiomyop.!	9.LJ 3 Geschwister an Kardiomyop verstorben;
	2 J. m (Bruder)	-	-	-	-	Kardiomyop.!	1 gesunde Sch s.o.
(2o)	29 J. w	+	-	-	+	Hypoglycämie; Myalgien;	-

Tabelle 13 (Forts):

Lit.	unters. Organ	Morphologie	Biochemie: Fr.Carn.	Patient Ges.C./KAC;	angeg. Kontrollen Fr.Carn.;	GesC. bzw. KAC	(n) Dim.	Bemerkungen Therapie
31)	Muskel	Lipid u.Glycogensp.;Mitoch.veränd.	7.0	7,1	20,6±6,7	K:1,4±1,2	(14)	erfolgreich Carnitin;
	Plasma		15,5-35,8;	3,9-29,6;	34,1±8,2	K:4,2±2,5	(9)	
88)	Muskel	Lipidspeicherg.;Glycogenvermind.;	0,44	-	2,67±0,46	-	(4)*	
	Herz	Verfettung	0,35	-	2,05;0,93;	-	*	
	Leber	dto.	0,96	-	0,8o±0,10;	-	(4)*	
	Serum		46	-	37 ± 2;	-	(29)	
	Muskel	geringe Lipidvermehrg.Typ1-F.;	0,34	-	s.o.	-	*	CPT erhöht!
	Serum		21	-	s.o.	-		
4o)	Muskel	Lipidsp. in d. meisten Typ1-F.;	0,52	-	1,34±0,33;	-	(3) *	lt.Autor kein Carn.-mangel! Tod vor Diagnosestellg.;
79)	Muskel	s. C 5 und Tab.11 und 12;	8,0	3,1	17,2±4,0;	K: 6,1±4,2	(13)	Tod vor Diagnosest.! Normwerte für Kinder
	Muskel	dto.						
	Serum etc.	dto.	5,9	4,2	s.o.	s.o.		Carnitintherapie!
33)	Muskel	Lipidspeicherg.	1,4	K:1,3	19,5±1,1;	K:1,9+_0,2	(?)	
	Leber	?	2,1;	K:0,6	8,3±1,7;	K:1,6 ±0,7	(?)	
	Plasma		3o,1;	K:5,3	39,5±5,2;	K: 4,3±3,4	(?))	
	Muskel	dto.	1,5;	K:1,0	s.o.;	K: s.o.		Carnitintherapie!
	Leber	?	7,0;	K:1,8	s.o.;	K: s.o.		
	Plasma		33,7;	K:11,o	s.o.;	K: s.o.		
57)	Muskel	Lipidsp.,Typ1-F.;	1,63;	3,26; G:4,98;	17,1±0,97;	G:22,8±1,06	F(31) G:(1o)	
	Serum		53,2; 28,0;	G:40,1;	51,6±2,48;	G:61,5±3,11	(20)	
9o)	Muskel	Lipidspeicherung	10,9;	-	nicht ang.;	-		angebl.normaler Carn. gehalt,jedoch erfolgr Carnitintherapie!
	Serum		40,1;	-	dto.	-		
25)	Muskel	Lipidvermehrg.,	-	G: 0,19	-	G:13.39±2,64	(9)	Carnitintherapie!
	Leber	dto.	-	G: 0,37	-	G: 6,8±0,7	(10)	
	Plasma		-	(?)G: 4,82	-	35,5±5,6	(10)	
94)	Muskel	Lipidspeicherg., Typ1-Fasern;	-;	G:o,03; K:0,0087;	-	;G:3 bis 9;K: ?	(?)	*Carnitintherapie!
	Plasma		- ;	G: 4,8; K: 1,2;	-	;G: 35-75; K: ?	(?)	
	Muskel	?	- ;	G: 0,00309;	-	;G: s.o.;		*
	Herz	Lipidspeicherung;	- ;	G: 0,0568; K:0,0118;	-	;G:0,906-1,2;		*
	Leber	Lipidspecherung;	- ;	G: 0,12o7;	-	;G:0,3-0,5;		*
	Plasma		-	-				
2o)	Muskel	Lipidspeicherung	0,50; 0,11; 0,28	G:0,69; 0,27; o,59	2,15±0,80;	G:2,15±0,92	(71) (67)	*C Carnitin erfolglos
	Plasma		15 ;	G: 33 ;	26 ± 4,5;	G:40,8±6,1	(1o)	

Tabelle 13 (Forts)

Literatur	Patient	Klinisches Bild: Hypotonie	Hepatomegalie	Encephalop.	Gewichtsverl.	Sonstiges	Beginn	Familie
(12)	20 J. w	+	+	-	-	Acidosen akute Verschl. nach Schw.sch. Nierenversagen; verstorben!	frühe Kindh.	-
(57)	7 M. w	?	+	+	+	Kardiomyop.; Hydrocephalus; Verstorben!	1.LW.	-
	13 M. w	+	-	+	+	verstorben	2.LMon.	-
	9 M. w	+	+	-		Kardiomyop.; verstorben		-

Tabelle 13 (Forts):

Lit.	unters. Organ	Morphologie	Biochemie:Patient Fr.Carni	Ges/AcylC.	Angegeb.Kontr. Fr.Carni	GC bzw. KAC	(n) Dim:	Bemerkungen
(12)	Muskel	Lipidspeicherung	0,49	-	13,92±0,92;	-	(18) (18)	Tod vor Diagn.stellg. CPT erh. in Muskel und Leber!
	Leber	dto.	0,99		6,8 ± 0,7;	-	(1o)	
(77)	Muskel	Lipidsp. Typ1-F.	1.84;	-	3,o6-5,33;	-	(?) *	Erfolglose Carn.-Therapie!
	Serum		14,5;44,8;	-	25 bis 65;	-	(?)	
	Muskel	dto.	1,64;	-	s.o.;	-	*	dto.
	Serum		47,6;49,9;	-	s.o.;	-		
	Muskel	dto.	1,82;	-	s.o.;	-	*	dto.
	Serum		20,0 [2];	-	s.o.;	-		

Gewebecarnitingehalte in µmol/g NCP; in einigen Fällen µmol/g Frischgew. (*) oder g Trockengew. (#);Serum:µmol/l;
Kontrollen: $\bar{x} \pm s$; G: Gesamtcarnitin; K: Kurzkettiges Acylcarnitin

erhebliche Unterschiede in der Klinik und vor allem im Verlauf der verschiedenen Erkrankungen. Nur bei einzelnen der beschriebenen Fälle konnte die Krankheit in Beziehung zu einem auslösenden Ereignis gesetzt werden, etwa einer Hungerperiode oder, wie in drei Fällen, einer Schwangerschaft. Letzteres ist interessant, da wie bereits erwähnt, nach Scholte et al (86) sowie Angelini et al (4) die Serumcarnitinspiegel im Verlauf der Schwangerschaft ganz erheblich abnehmen. Für Patientinnen mit Carnitinmangel ergäbe sich daraus, daß jede Schwangerschaft ein erhöhtes Risiko darstellt. Auf jeden Fall sollten die Serumcarnitinwerte genau verfolgt und bei Auftreten myopathischer Symptome sofort eine orale Carnitintherapie eingeleitet werden. Das Alter der Erstmanifestation variiert sowohl beim Systemischen als auch beim Muskelcarnitinmangel erheblich, reicht vom frühen Säuglingsalter bis zu 17 Jahren beim Systemischen Carnitinmangel, vom Kleinkindes- bis ins mittlere Lebensalter beim Muskelcarnitinmangel. Die Schwere des Verlaufs ist ebenfalls ganz unterschiedlich ausgeprägt. So verlaufen die "Systemischen Carnitinmangelerkrankungen" zwar wohl in der Regel schwerer, und es wurden auch einige letale Verläufe beschrieben. Es gibt daneben jedoch auch offensichtlich prolongiertere, leichter verlaufende Formen. Systemischer Carnitinmangel ebenso wie Muskelcarnitinmangel sprechen äußerst unterschiedlich auf die orale Gabe von Carnitin an.

Bei etwa der Hälfte der Fälle zeigt sich eine rasche Besserung des Krankheitsbildes, während andere Patienten nicht auf die Therapie ansprechen, ohne daß dies durch erkennbare Besonderheiten der Erkrankung erklärbar wäre. Allenfalls würde der Erfolg einer Carnitintherapie wahrscheinlich gemacht, wenn Muskelhomogenate des Patienten eine verminderte Palmitatoxydation aufweisen, die sich auf Carnitinzusatz bessert (37), (98).

Außerdem wurde über einige Patienten berichtet, die sowohl Zeichen des Muskelcarnitinmangels mit normalem Serumcarnitinspiegel zeigen, gleichzeitig jedoch auch erniedrigte Lebercarnitingehalte oder eine Kardiomyopathie aufweisen und damit Kriterien des Systemischen Carnitinmangels erfüllen (siehe Hart et al (51) und Scholte et al (88)).

Tripp et al beschrieben einen familiär auftretenden Systemischen Carnitinmangel, der klinisch vorwiegend als Kardiomyopathie (Endocarotfibroelastose) inponierte, die sich auf orale Carnitingabe zurückbildete. Ein Carnitinmangel wäre demnach eine stets mit zu erwägende Ursache für angeborene Kardiomyopathien (siehe (94) sowie Tabelle 13).

Die Zusammenstellung zeigt, daß die Einteilung in "Systemischen Carnitinmangel" und"Muskelcarnitinmangel" wohl zu grob ist und daß sich hinter den

gemeinsamen morphologischen und biochemischen Veränderungen eventuell noch andere Störungen verbergen können. So scheint eine Verarmung des Körpers an Carnitin, wie sie etwa Rudman et al (83) bei kachektischen Patienten fanden, für sich noch keine Funktionsstörungen auszulösen. Auch finden sich bei Schwangeren in der Regel zum Zeitpunkt der Geburt keine myopatischen Erscheinungen, obwohl der Carnitingehalt im Serum erheblich abnimmt. Die Mechanismen, die im einzelnen dann zu manifesten Mangelsyndromen führen, sind bisher noch nicht bekannt.

Als Ursache für einen Carnitinmangel kommt ein angeborener oder erworbener Stoffwechseldefekt in Frage. Pathogenetisch wären als mögliche Störungen zu berücksichtigen: Eine fehlende oder gestörte Carnitinbiosynthese, die ungenügende Resorption von Carnitin oder seinen Vorläufern aus der Nahrung oder eine Mangelernährung, ferner ein gestörter Transport von Carnitin in die und aus den Zellen, ein gestörter Carnitinstoffwechsel in der Zelle, sowie ein beschleunigter Abbau oder eine beschleunigte Ausscheidung des Carnitins.

Eine Störung der Biosynthese wurde als Ursache des "Systemischen Carnitinmangels" ursprünglich von Engel diskutiert (38). Bereits die Beobachtung von Rudman et al (83), wonach unter normalen Ernährungsbedingungen die Carnitinbiosynthese nur einen geringen Beitrag zum gesamten im Körper

vorhandenen Carnitin zu leisten scheint, ließ diese Möglichkeit fraglich erscheinen (siehe Pongratz et al (79)). Mittlerweile konnten Rebouche und Engel (82) durch Untersuchung der an der Carnitinbiosynthese beteiligten Enzyme eines Patienten mit "Systemischen Carnitinmangel" für diesen eine solche Störung sicher ausschließen.

Untersuchungen zur Carnitinresorption aus der Nahrung sind spärlich. Der von Karpati et al beschriebene Patient mit "Systemischem Carnitinmangel" erreichte unter Therapie mit 2 g/die D,L-Carnitin normale Serumspiegel. Auch bei anderen oral mit Carnitin behandelten Patienten stieg der Carnitinspiegel im Serum im Unterschied zum Muskelcarnitingehalt nach der Einnahme an. Hierzu ist jedoch zu bemerken, daß diese Anstiege erst bei sehr hohen Carnitinkonzentrationen im Darm erfolgen, obwohl davon auszugehen ist, daß die normalerweise mit der Nahrung zugeführte, wesentlich niedrigere Carnitinmenge ausreichen müßte, um dennoch einen normalen Carnitinspiegel zu erreichen. Eine Resorptionsstörung für Carnitin ist demnach als Ursache der erniedrigten Serumspiegel möglich. Angelini et al (3) konnten bei einem Patienten unter Carnitintherapie (15 g L-Carnitin/die) im Vergleich zu einer Kontrollperson nur einen geringen Anstieg des Carnitins im Plasma finden. Der kurzzeitig über die Norm erhöhte Plasmaspiegel fiel dann bereits nach drei Stunden wieder auf die untere Grenze der Norm ab, während er bei der Kontrolle erhöht blieb. Leider wurden die Acylcarnitine

hierbei nicht bestimmt, so daß eine eventuelle Umverteilung nicht erfaßt werden kann (siehe hierzu Brass und Hoppel (15)). Denkbar wäre jedoch auch eine Störung von Resorption und Ausscheidung von Carnitin.

Eine Störung des aktiven Transportes von Carnitin in die Muskelzelle wurde als Ursache des Muskelcarnitinmangels vermutet, konnte jedoch beim Menschen nicht sicher nachgewiesen werden(Willner, Di Mauro (98)). Außerdem muß festgestellt werden, daß bei einigen der Patienten die Muskelcarnitinspiegel, obwohl deutlich vermindert, doch noch immer erheblich über den Serumspiegeln liegen, was einen völligen Ausfall des Transportsystems unwahrscheinlich macht. Außerdem wäre der Erfolg einer Carnitintherapie in diesem Fall nur schwer erklärbar.

Die Störung des Carnitinefflux der Zelle wurde bisher nicht untersucht, muß jedoch in Betracht gezogen werden. Untersuchungen zum Abbau von Carnitin und zur Ausscheidung liegen nur begrenzt vor. Ein kürzlich von Chapoy et al (25) beschriebener Patient unter oraler Therapie schied jedoch offenbar stets erheblich weniger Carnitin aus, als ihm zugeführt wurde, was eine Ausscheidungserhöhung als der Störung zugrundeliegenden Defekt in diesem Falle unwahrscheinlich macht.

Engel et al (39) konnten neuerdings bei zwei Patienten mit "Systemischem Carnitinmangel" eine verminderte renale Reabsorption von Carnitin nachweisen und vermuten einen renalen Carnitinverlust

als Ursache des Carnitinmangels. Carroll und Brooke (19) konnten außerdem zeigen, daß die renale Clearance für Acylcarnitin um ein mehrfaches über der von freiem Carnitin liegt. Diesem Befund zufolge könnte eine Fehlverteilung mit einer Verschiebung zugunsten der Acylcarnitine erhebliche Carnitinverluste zur Folge haben.

Am ehesten kommt als Ursache für den Carnitinmangel zumindest des Skelettmuskels wohl doch eine Störung des Transports in Frage, eventuell zusammen mit einem erhöhten Carnitinverlust der Zelle. Die Rolle eines, z.B. aufgrund eines Carnitinacetyltransferasedefektes veränderten Acetylcarnitin- zu Carnitinverhältnisses bei solchen Störungen müsste dabei noch untersucht werden. Denkbar ist auch die von Engel diskutierte Transportstörung eines Vorläufers von Carnitin, des γ-Butyrobetains, in Zellen, die zum endgültigen Schritt der Carnitinbiosynthese befähigt sind, woraus sich eine sekundäre Biosynthesestörung ergäbe, die eine Störung der direkt beteiligten Enzyme nicht erforderte. Im Widerspruch hierzu stehen jedoch meiner Ansicht nach die Transportstudien an Zellen (1o), (28), die eher auf einen den beiden Verbindungen gemeinsamen Transportweg hinweisen.

Die Diagnose eines Carnitinmangels sollte erwogen werden bei sich, eventuell im Zusammenhang mit Nahrungsentzug verschlimmernden Myopathien, die in der Muskelbiopsie die typische Lipidspeicherung der Typ

I Fasern zeigen. In diesem Falle ist eine Bestimmung des Muskelcarnitingehaltes und der Aktivität der Acyltransferasen sinnvoll. Auch die Aktivität der AcylCoA-Synthetase sollte, falls möglich, bestimmt werden, um einen vorgelagerten Defekt auszuschließen. Die Bestimmung des Serumcarnitinspiegels führt bei eindeutig nur myopatischem Bild wohl selten zu einem pathologischen Befund, während sie bei gleichzeitigem Auftreten von zerebralen, kardialen oder Lebersymptomen als einfachste erste Untersuchung sofort durchgeführt werden sollte. Ist der Serumcarnitinspiegel gleichzeitig mit dem Muskelcarnitinspiegel erniedrigt, so ist der "Systemische Carnitinmangel" wohl auch ohne Leberbiopsie gesichert.

Nach den bereits zitierten Befunden von Tripp et al (94) kann beim Carnitinmangel die Kardiomyopathie ganz das klinische Bild beherrschen: Hart et al (51) und eigenen Ergebnissen (Tab. 12) zufolge muß dabei der Serumcarnitinspiegel nicht immer erniedrigt sein. Klärung bringt in diesen Fällen jedoch meist die Skelettmuskelbiopsie.

Als ergänzende Laboruntersuchungen, die auf einen Carnitinmangel hinweisen können, seien der fehlende Anstieg der Ketonkörper beim Fasten, eventuell anzutreffende Erhöhungen der SGOT, LDH und CK im Serum sowie ein überschießender Lactatanstieg bei ischämischer Muskelarbeit genannt. Außerdem scheinen bei den Fällen von "Systemischem Carnitinmangel" in akuten Exacerbationsphasen häufig extrem miedrige Blutzucker vorzuliegen, die auch therapeutisch angegangen

werden müssen.

Auch wenn nicht in allen Fällen erfolgreich, sollten die relativ unbedeutenden Nebenwirkungen, sowie die im Erfolgsfall eindeutige und bleibend zu erzielende Besserung den Versuch einer oralen Carnitintherapie unter allen Umständen nahelegen. Sie kann durch Gabe mittelkettiger Fettsäuren (MCT Wander) und eine fettarme, kohlenhydrat- und fleischreiche Diät wirksam ergänzt werden.
Als weitere therapeutische Möglichkeit bleiben die Cortison-, sowie die in einigen Fällen berichtete Propranololgabe (siehe Tabelle 13).

Besonders bei den mehrfach, so auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit, beschriebenen Fällen von "Systemischem Carnitinmangel", der sich gleich nach der Geburt äußert sowie bei den schweren Kardiomyopathien kann durch rechtzeitige Diagnosestellung und rasche Therapie ein sonst letaler Verlauf möglicherweise verhindert werden.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Das Verfahren von Marquis und Fritz zur optisch-enzymatischen Carnitinbestimmung wurde modifiziert so dass empfindlich und ohne Störung durch freie SH-Gruppen freies Carnitin und säurelösliches Gesamtcarnitin in Serum und Gewebsextrakten nebeneinander bestimmt werden können.
2. An einer der umfangreichsten bisher untersuchten Kontrollgruppen von 51 gesunden Erwachsenen wurden Normalwerte für freies Carnitin, Gesamtcarnitin und kurzkettiges Acylcarnitin im Serum erstellt. Freies Carnitin war den Untersuchungen zufolge bei Frauen niedriger als bei Männern.
3. Erhöhte Serumcarnitinspiegel fanden sich bei Niereninsuffizienz und Fettsucht. Dabei war jeweils der Anteil des Acylcarnitins besonders erhöht. Im Hunger fiel bei den Fettsüchtigen das freie Carnitin stark ab, während das Acylcarnitin anstieg. Ein kurzzeitiger Anstieg des kurzkettigen Acylcarnitins wurde bei Muskelarbeit beobachtet.
4. Drei Patienten im diabetischen Coma zeigten extreme Erhöhungen von freiem Carnitin und, der gesteigerten Ketogenese entsprechend, kurzkettigem Acylcarnitin im Serum, die sich unter Therapie parallel zum Blutzuckerspiegel wieder normalisierten.
5. Carnitin wurde in Granulocyten, Mononukleären Zellen und erstmals auch in Erythrocyten nachgewiesen. Letztere zeigen zudem noch eine Anreicherung von Acylcarnitin gegenüber dem Plasma.
6. Normalwerte für freies Carnitin, Gesamtcarnitin, kurzkettiges Acylcarnitin, sowie für die CPT-Aktivität im Muskel wurden bestimmt. Der Carnitingehalt im Muskel war bei Kindern niedriger als bei Erwachsenen. Noch niedrigere Muskelcarnitingehalte wurden bei Knaben mit M.Duchenne gefunden.

7. Muskelbiopsien von 24 Patienten mit metabolischen Myopathien wurden untersucht. Dabei fand sich bei 5 der 9 untersuchten Lipidspeichermyopathien, sowie bei einer Kardiomyopathie mit Lipidspeicherung im Skelettmuskel ein erniedrigter Muskelcarnitingehalt. Es werden 5 dieser Fälle von Carnitinmangel eingehend beschrieben.
8. Anhand der Literatur wird der Stoffwechsel von Carnitin beim Menschen dargestellt und mit einer Übersicht über die bisher beschriebenen Fälle von Carnitinmangel-Syndromen werden Pathogenese, Klinik, biochemische Diagnostik, Differentialdiagnose und Therapie dieser Erkrankung erläutert.

LITERATURVERZEICHNIS

(1) ALTMAN, P.L., DITTMER, D.S. (Hrg.)
Biology Data Book, Bethesda, Md., USA (1972), S. 392

(2) ANGELINI, C. (1975)
J.Neurol. 214: 1

(3) ANGELINI, C., LÜCKE, S., CANTARUTTI, F. (1976)
Neurology No. 26: 633

(4) ANGELINI, C., GOVONI, E., BRAGAGLIA, M.M., VERGANI, L. (1978)
Ann.Neurol. 4: 558

(5) BERTORINI, T., YEH, Y.Y., TREVISAN, C., STADLAN, E., SABESIN, S., DiMAURO, S. (198o)
Neurology 3o: 263

(6) BØHMER, T., RYDNING, A., SOLERRG, H.E. (1974)
Clin.Chim.Acta 57: 55

(7) BØHMER, T., HANSSON, V.,(1975)
Molec.Cell.Endocr. 3: 103

(8) BØHMER, T., EIKLIND, K., JONSON, J.(1977)
Bioch.Bioph.Acta 465: 627

(9) BØHMER, T.,(1978)
Mol.Cell.Endocr. 11: 213

(1o) BØHMER, T., MOLSTAD, P. (198o)
in (43), S.73

(11) BORUM, P.R. (1980)
in (43), S.115

(12) BOUDIN, G., MIKOL, J., GUILLARD, A., ENGEL, A.G. (1976)
J. Neurol. Sci., 30: 315

(13) BOYUM, A.,(1968)
Scand.J.Clin.Lab.Invest. 21 (Suppl.): 97

(14) BRASS, E.P., HOPPEL, C.L. (1978)
J.Biol.Chem. 253: 2688

(15) BRASS,E.P., HOPPEL, C.L. (1980)
Bioxhem.J. 190: 495

(16) BROOKS, D.E., HAMILTON, D.W., MALLEK, A.H. (1974)
J.Reprod.Fert. 36: 141

(17) BROOKS, D.E. (1978)
Biochem.J. 174: 741

(18) BROOKS, D.E. (1978)
Biol.Reprod. 18: 629

(19) CARROLL, J.E., BROOKE, M.H. (198o)
Neurology 3o: 369 (Abstr.)

(2o) CARROLL, J.E., BROOKE, M.H., DEVIVO, D.C., SHUMATE, J.B., KRATZ, R., RINGEL, St.P., HAGBERG, J.M. (198o)
Neurology 3o: 618

(21) ( ) CEDERBLAD, G., LINDSTEDT, S. (1971)
Clin.Chim.Acta 33:117

(22) CEDERBLAD, G., LINDSTEDT, S. (1972)
Clin.Chim.Acta 37: 235

(23) CEDERBLAD,G., LINDSTEDT, S., LUNDHOLM, K. (1974)
Clin.Chim.Acta 53: 311

(24) CEDERBLAD,G. (1976)
Clin.Chim.Acta 67: 201

(25) CHABOY, P.R., ANGELINI, C., BROWN, W.J., STIFF, J.E., SHUG, A.L., CEDERBAUM, S.D. (1980)
NewEngl.J.Med. 3o3: 1389

(26) CHEN, S.-H., LINCOLN, S.D. (1977)
Clin.Chem. 23:278

(27) CHOI, Y.R., FOGLE, P.J., CLARKE, P.R.H., BIEBER, L.L. (1977)
J.Biol.Chem. 252: 793o

(28) CHRISTIANSEN, R.Z., BREMER, J. (1976)
Biochem.Biophys.Acta 448: 562

(29) CHRISTIANSEN, R.Z., BREMER, J. (1978)
FEBS-lett. 86: 99

(30) CORNELIO, F., DiDONATO, S., PELUCHETTI, D., BIZZI, A., BERTAGNOLIO, B., D'ANGELO, A., WIESMANN, U. (1977)
J.Neurol.Neuros.Psych. 40: 170

(31) DiDONATO, S., CORNELIO, F., BALESTRINI, B., BERTAGNOLIO, B., PELUCHETTI, D. (1978)
Neurology 28: 111o

(32) DiDONATO, S., CORNELIO, F., STACHI, G., RIMOLDI, M. (1979)
Neurology 29: 780

(33) DiDONATO, S., PELUCHETTI, D., RIMOLDI, M., BERTAGNOLIO, B., UZIEL, G., CORNELIO, F. (1980)
Clin.Chim.Acta 1oo: 209

(34) DiMAURO, S., MELIS-DiMAURO, P. (1973)
Science 180: 329

(35) Di MAURO, S., SCOTT, C., PENN, A.S., ROWLAND, L.P. (1973)
Arch. Neurol. 28: 186

(36) ENGEL, A.G., SIEKERT, (1972)
Arch.Neurol. 27: 174

(37) ENGEL, A.G., ANGELINI, C. (1973)
Science 179: 899

(38) ENGEL, A.G., BANKER, B.Q., EIBEN, R.M. (1977)
J,Neurol.Neuros.Psych. 40: 313

(39) ENGEL, A.G., REBOUCHE, C.J., WILSON, D.M., GLASGOW, A.M., ROMSHE, C.M.(1980)
Neurology 3o: 368 (Abstr.)

(40) ESIRI, M.M., BOWER, B.D., ROSS, B.D. (1979)
J.Neur.Sci. 41: 93

(41) FRAENKEL, G., FRIEDMAN, S. (1957)
in HARRIS, R., MARRIAN, G., THIEMANN, K. (Hrg:)Vitamins and Hormones,15: 73

(42) FRAENKEL, G.,(1980)
in (43), S. 1

(43) FRENKEL, R.A., McGARRY, D. (Hrg.)
Carnitine:Biosynthesis, Metabolism and Function,Acad.Pr., NY,USA; (1980)

(44) FRITZ, I.B. (1955)
ActaPhysiol.Scand. 34: 367

(45) FRITZ, I.B., McEWEN (1959)
Science 129: 334

(46) FRITZ, I.B. (1963)
in PAOLETTI, R., KRITCHEVSKY, D.(Hrg.):Adv.LipidRes. 1: 285

(47) FRITZ, I.B., SCHULTZ, S.K., SRERE, P.A. (1963)
J.Biol.Chem. 238: 2509

(48) GENUTH, S.M., HOPPEL, C.L. (1979)
Diabetes 28: 1083

(49) GENUTH, S.M., HOPPEL, C.L. (1981)
Metabolism 3o: 393

(50) HARANO, Y., KOWAL, J., YAMAZAKI, R,, LAVINE, L., MILLER, M. (1972)
Arch.Bioch.Bioph. 153: 426

(51) HART, Z.H., CHANG, C.-H., DiMAURO, S., FAROOKI, Q., AYYAR, R. (1978)
Neurology 28: 147

(52) HOPPEL, C.L., TOMEC, R.J. (1972)
J.Biol.Chem. 247: 832

(53) HOPPEL, C.L., GENUTH, S.M. (1980)
Am.J.Physiol. 238: E 409

(54) HOSKING, G.P., CAVANAGH, N.C.P., SMYTH, D.P.L., WILSON, J. (1977)
Lancet 16.4.1977: 853

(55) IKEAKOR, I.P., LAKE, B.D. (1978)
Clin.Chim.Acta 82: 197

(56) ISAACS, H., HEFFRON, J.J.A., BADENHORST, M., PICKERING, A. (1976)
J.Neurol.Neuros.Psych. 39: 1114

(57) JERUSALEM, F., ENGEL, A.G., SENGUPTA, C., IMBACH, P., LÄMMLI, J. (1980)
Dt.Med.Wochenschr. 105: 469

(58) KARPATI, G., CARPENTER, St., ENGEL, A.G., WATTERS, G., ALLEN, J., ROTHMAN, St., KLASSEN, G., MAMER, O.A. (1975)
Neurology 25: 16

(59) KHAIRALLAH, E.A., WOLF, G. (1967)
J.Biol.Chem. 242: 32

(60) KÖNIG, B., McKAIGNEY, E., CONTEH, S., ROSS, B.D. (1978)
Clin.Chem.Acta 88: 121

(61) LILIENTHAL, J.L., ZIERLER, K.L., FOLK, B.P., BUKA, R., RILEY, M. (1950)
J.Biol.Chem. 182: 501

(62) LINDSTEDT, S., LINDSTEDT, G. (1961)
Acta Chim.Scand. 15: 701

(63) LIPSCHITZ, D.A., COOK, J.D., FINCH, C. (1975)
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 148: 358

(64) LOWRY, D.H., ROSEBROUGH, N.Y., FARR, A.L., RANDALL, F.J. (1951)
J.Biol.Chem. 193: 265

(65) McGARRY, J.D., FOSTER, D.W. (1976)
J.Lipid Res. 17: 277

(66) MAEBASHI, M., KAWAMURA, N., YOSHINAGA, K. (1974)
Nature 249: 173

(67) MAEBASHI, M., KAWAMURA, N., SATO, M., YOSHINAGA, K., SUZUKI, M. (1976)
J.Lab.Clin.Med. 87: 760

(68) MARKESBERRY, W.R., McQUILLEN, M.P., PROCOPIS, P.G., HARRISON, A.R., ENGEL, A.G. (1974)
Arch.Neurol. 31: 320

(69) MARQUIS N.R., FRITZ, I.B. (1964)
J.Lipid Res. 5: 184

(70) MARQUIS, N.R., FRITZ, I.B. (1965)
J.Biol.Chem. 240: 2197

(71) MEHLMAN, M.A., ABDELKADER, M.M., THERIAULT, D.G. (1969)
Life Sci. 8: 465

(72) MITCHELL, M.E. (1978)
Am.J.Clin.Nutr. 31: 293 sowie a.a.O. 31: 489 und a.a.O. 31 : 645

73) MOLSTAD, P. (1980)
Bioch.Bioph.Acta 597: 166

74) MORTIER, W., PRZYREMBEL, H., SCHOLTE, J., v.BASSEWITZ, D.B. (1981)
Fortschr.d.Myologie 4: 11

75) NAKAO, M., NAKAYAMA, T., KAMAKURA, T. (1973)
Nature 246: 94

76) NATELSON, S., NATELSON, N.E. (Hrg.)
Princ.Appl.Clin.Chem. New York, London (1978), Bd.2: Kap.2

77) PANDE, S.V., PARVIN, R. (1980)
in (43), S. 143

78) PEARSON, D.J., TUBBS, P.K. (1967)
Biochem.J. 1o5: 953

79) PONGRATZ, D., HÜBNER, G., DEUFEL, T., WIELAND, O., PONGRATZ, E., LIPHARDT, R. (1979)
Klin.Wochenschr. 57: 927

80) REBOUCHE, C.J. (1979)
Bioch.Bioph.Acta 471: 145

81) REBOUCHE, C.J., ENGEL, A.G. (1980)
Biochem.Bioph.Acta 630: 22

82) REBOUCHE; C.J., ENGEL, A.G.,(1980)
Clin.Chim.Acta 1o6: 295

83) RUDMAN, D,, SEWELL; C.W., ANSLEY, J.D. (1977)
J.Clin.Invest. 6o: 716

84) SCARLATO, G., ALBIZZATI, M.G., BASSI, S., CERRI, C., FRATTOLA, L. (1977)
Eur.Neurol. 16: 222

85) SCHMIDT-SOMMERFELD, E., NOVAK, M., PENN, D., WIESER, P.B., BUCH, M. HAHN, P. (1978)
Pediatr.Res. 12: 66o

86) SCHOLTE, H.R., STINIS, J.F.; JENNEKENS, F.G.J. (1978)
New Engl.J.Med. 299: 1079

87) SCHOLTE, H.R., JENNEKENS, F.G.I., BOUVY, J.J.B. (1979)
J.Neur.Sci. 4o: 39

88) SCHOLTE; H.R., MEIJER, A.E.F.H., vanWIJNGARDEN, G.K., LEENDERS, K.L. (1979)
J.Neur.Sci. 42: 87

89) SEIM, H., STRACK, E. (1977)
Hoppe-Seyler's 358: 675

(90) SENGERS, R.C.A., BAKKEREN, J.A.J.M., TRIJBELS, J.M.F., STADHOUDERS, G.J.M. EGBERINK, G.J.M., terLAAK, H.J., JASPAR, H.J.J. (1980)
Eur.J.Pediatr. 135: 205

(91) SMYTH, D.P.L., LAKE, B.D., McDERMOT, J., WILSON, J. (1975)
Lancet 25.5.1975: 1198

(92) SOLBERG, H.E. (1972)
Bioch.Bioph.Acta 28o: 422

(93) TANPHAICHITR, V., BROQUIST, H.P. (1973)
J.Biol.Chem. 248: 2176

(94) TRIPP, M.E., KATCHER, M.L., PETERS, H.A., GILBERT, E.F., ARYA, S., HODACH, R.J., SHUG, A.L. (1981)
N.Engl.J.Med. 3o5: 385

(95) VANDYKE, D.H., GRIGGS, R.C., MARKESBERRY, W., DiMAURO, S. (1975)
Neurology 25: 154

(96) VOLLSET, S.E., FARSTAD, M. (1979)
Scand.J.Clin.Lab.Invest. 39: 15

(97) WEST, D.W., CHASE, J.F.A., TUBBS, P.K. ((1971)
Bioch.Bioph.Res.Comm. 42: 912

(98) WILLNER, J.H., DiMAURO, S. (1978)
Neurology 28: 365 (Abstr.)

(99) WILLNER, J.H., GINSBURG, S., DiMAURO, S. (1978)
Neurology 28: 761

(100) WITTELS, B., HOCHSTEIN, P. (1967)
J.Biol.Chem. 242: 126

(101) YATES, D.W., GARLAND, P.B. (1966)
Bioch.Biophys.Res.Comm. 23: 460

(102) YUE, K.T.N., FRITZ, I.B. (1962)
Am.J.Physiol. 2o2: 122

DANK:

Die hier vorgelegte Arbeit entstand in der Zeit von Januar 1978 bis März 1981 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. O. Wieland. Von ihm habe ich während dieser Zeit viele wertvolle und interessante Anregungen und die nötige Kritik erfahren. Ich habe viel gelernt. Dafür möchte ich mich von Herzen bedanken.

Herrn Prof. Dr. D. Pongratz habe ich besonders zu danken für die Überlassung von zahlreichen Muskelbiopsie-proben, sowie für seine Hilfe beim Zusammenstellen klinischer Daten der untersuchten Patienten.
Ebenso danke ich Fr. Dr. R. Dollhofer, H. Dr. K. Gerbitz, und H. Dr. K.-H. Rudolph, die mir Serumproben zur Verfügung gestellt haben.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Forschergruppe Diabetes, besonders H. Dr. E. Siess, danke ich herzlich für die gute Zusammenarbeit, für anregende Diskussionen und praktische Hilfe bei der Arbeit.

Fr. Rausch hat die Abbildungen angefertigt, für die ich mich herzlich bedanke.

Die Arbeit wurde von der DFG gefördert.

LEBENSLAUF:

Thomas Deufel
Geboren am 1. März 1954 in Abensberg
Eltern: Dr. rer. nat. Paul Deufel
Rita Deufel, geb. Glatt

1960	Volksschule an der Herrnstrasse, München
1961 - 1964	Volksschule a.d. Haldenbergerstr., München
1964 - 1971	Wittelsbacher Gymnasium, München
Mai 1971	Abitur
1971 (WS)	Beginn des Chemiestudiums, Universität München
Okt. 1974	Vordiplomprüfung, Chemie
seit 1973 (WS)	zusätzlich Medizinstudium
März 1975	Ärztliche Vorprüfung
Mai 1980	Dritter Teil der Ärztlichen Prüfung und Approbation als Arzt
Jan. 1978 bis 1981	Doktorarbeit in der Forschergruppe Diabetes unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. O. Wieland